



# **Gestión de un proceso de biorremediación bacteriana de suelo contaminado con crudo en condiciones anaeróbica**

**Alejandra Daniela Delgado Vallejo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente  
Medellín, Colombia  
2017



# **Gestión de un proceso de biorremediación bacteriana de suelo contaminado con crudo en condiciones anaeróbica**

**Alejandra Daniela Delgado Vallejo**

Tesis presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Medio Ambiente y Desarrollo**

Director (a):

PhD, Santiago Alonso Cardona Gallo, PhD

Codirector (a):

PhD, Juan Carlos Pérez Naranjo

Línea de Investigación:

Biorremediación de suelos

Grupo de Investigación:

Biorremediación y Desarrollo Tecnológico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente

Medellín, Colombia

2017



## **Dedicatoria**

*A mi familia por el apoyo que siempre me han  
brindado*



# Agradecimientos

A mi familia, a mis padres y hermano por haber creído en mí, su apoyo incondicional a lo largo de este proceso.

Al Profesor Santiago Alonso Cardona Gallo por su acompañamiento como Director de la Tesis de Maestría y por sus enseñanzas y consejos.

Al Profesor Juan Carlos Pérez Naranjo por su cordial asesoría a lo largo de esta investigación.

A la Profesora Alejandra Arbeláez Londoño por su valiosa colaboración.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por el apoyo a través del Laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico.

A la Facultad de Minas de la Universidad Nacional de Colombia por haberme otorgado la beca de exención de derechos académicos.

A Catalina Trejos Delgado, Maria Angélica Prada y Alexander Agudelo por sus valiosas enseñanzas, consejos, fortaleza en los momentos difíciles y su gran amistad.

A Alejandro Martínez Rivera por su apoyo durante el proceso de investigación y su gran amistad.

A Cristian Camilo Beltrán Castillo por la paciencia y su amistad en este proceso.

A Cristhian Bernardo Morales Monsalve por su apoyo incondicional y siempre estar presente





## Resumen

En Colombia los atentados contra la infraestructura petrolera empezaron en los años 80 y continúan en la actualidad, lo que ha generado daños en el medio ambiente y en la salud humana. En la presente investigación se evaluó la biodegradación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) en condiciones anaerobias de un suelo de la vereda Silvania, Putumayo. En la investigación se evaluaron dos tecnologías, bioestimulación y biorremediación, además se contó con un tratamiento de control y un tratamiento de atenuación natural. El tratamiento de bioaumentación se dividió en: Bioaumentación (B) y Bioaumentación con surfactante (BS) ambos tratamientos poseen un 10% (p/p) de compost para aumentar la densidad bacteriana y al último se le agregó el surfactante Tween 80 cuya concentración fue de una vez la concentración micelar crítica (CMC). Por otra parte se cuenta con tres tratamientos de bioestimulación, Bioestimulación (BE), Bioestimulación con surfactante (BES) y Bioestimulación con surfactante y D-Limoneno (BESL), estos tratamientos cuentan con la adición de nutrientes como Nitrógeno y Fósforo que fue determinada mediante el método de McCarthy y enmiendas como melaza y leonardita. Después de 90 días la degradación de HTP fueron de 53,8% 57,7% 65,4% 69,2% 75,9% 76,9% y 76,9% para los tratamientos Control, Bioaumentación, Bioaumentación con surfactante, Bioestimulación, Bioestimulación con surfactante y Bioestimulación con surfactante y D-Limoneno respectivamente.

**Palabras clave:** Petróleo, Biorremediación en condiciones anaerobias, HTP, Suelo, surfactante.

## Abstract

In Colombia, the attacks against the oil infrastructure began in 1980 and continue today, these attacks cause damage to the environment and human health. In the present investigation, the biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) was assessed in anaerobic conditions of a soil come from Silvania, Putumayo. In the research, two technologies, biostimulation and bioremediation were assessed, as well as a control treatment and a natural attenuation treatment. The bioaugmentation treatment was divided into: Bioaugmentation (B) and surfactant bioaugmentation (BS) both treatments have a 10% (w/w) of composting to increase the bacterial density and the last was added the surfactant Tween 80 whose concentration was at once the critical micelle concentration (CMC). On the other hand there are three biostimulation treatments, Biostimulation (BE), Biostimulation with surfactant (BES) and Biostimulation with surfactant and D-Limonene (BESL), these treatments have the addition of nutrients such as Nitrogen and Phosphorus that were determined by McCarty's method and amendments such as molasses and leonardite. After 90 days the degradation of TPH were of 53.8% 57.7% 65.4% 69.2% 75.9% 76.9% and 76.9% for the treatments Control, Bioaugmentation, Bioaugmentation with surfactant, Biostimulation, Biostimulation with surfactant and Biostimulation with surfactant and D-Limonene respectively.

**Keywords:** Oil, anaerobic bioremediation, TPH, Soil, Surfactant

# Contenido

Tabla de contenido

<b>Dedicatoria.....</b>	<b>V</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>9</b>
2.1. Pregunta de investigación .....	10
2.2. Objetivo general .....	10
2.3. Objetivos específicos .....	10
2.4. Hipótesis .....	10
2.5. Alcances .....	11
2.6. Justificación.....	11
<b>3. Marco teórico.....</b>	<b>13</b>
3.1. El suelo .....	13
3.1.1. Clima .....	13
3.1.2. Organismos .....	14
3.1.3. Relieve .....	15
3.1.4. Tiempo .....	15
3.2. Petróleo crudo.....	16
3.2.1. Definición química .....	16
3.2.2. Definición física.....	18
3.3. Biorremediación .....	18
3.3.1. Biorremediación in-situ .....	19
3.3.2. Biorremediación ex-situ .....	19
3.4. Surfactante.....	20
3.5. Leonardita .....	22

3.6.	Melaza .....	22
3.7.	Compost .....	23
3.8.	Factores que intervienen en la biorremediación .....	24
3.8.1.	Textura .....	24
3.8.2.	Humedad.....	24
3.8.3.	Potencial de Hidrógeno .....	25
3.8.4.	Potencial redox.....	25
3.8.5.	Temperatura.....	25
3.8.6.	Disponibilidad de nutrientes.....	25
3.8.7.	Aceptor y donador de electrones .....	26
<b>4.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>27</b>
4.1.	Materiales y métodos .....	28
4.1.1.	Diseño de experimentos .....	28
4.1.2.	Equipos y Reactivos .....	28
4.1.3.	Recolección de muestra del suelo contaminado .....	29
4.1.4.	Pretratamiento de la muestra de suelo .....	29
4.1.5.	Caracterización de la muestra de suelo .....	29
4.1.6.	Montaje a escala de laboratorio .....	30
4.1.7.	Cálculo dosificación de nutrientes .....	31
4.1.8.	Cuantificación y cualificación de hidrocarburos totales del petróleo .....	31
4.1.9.	Recuento en placa .....	32
4.1.10.	Potencial de Hidrógeno .....	33
4.1.11.	Potencial Redox .....	33
4.1.12.	Humedad .....	33
4.1.13.	Patrón de emisión de gases .....	33
<b>5.</b>	<b>Análisis de resultados .....</b>	<b>37</b>
5.1.	Cálculo dosificación de nutrientes .....	37
5.2.	Parámetros fisicoquímicos .....	39
5.2.1.	Potencial redox.....	39
5.2.2.	Potencial de Hidrógeno .....	41
5.2.3.	Conductividad eléctrica .....	42
5.3.	Número de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas .....	43
5.4.	Concentración de HTP remanentes .....	45
5.5.	Caracterización fisicoquímica del suelo .....	48
5.6.	Patrón de emisión de gases en los microcosmos.....	49
5.7.	Formulación del plan de manejo ambiental para biorremediación suelos contaminados con Hidrocarburos .....	61
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>69</b>
6.1.	Conclusiones .....	69
6.2.	Recomendaciones .....	71
<b>A.</b>	<b>Anexo: Determinación de la fórmula molecular del contaminante .....</b>	<b>73</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo : Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos.....</b>	<b>75</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo : Detección de gases.....</b>	<b>77</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>80</b>



## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<i>Figura 3-1 Hidrocarburos alifáticos y aromáticos.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4-1 Metodología de trabajo.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 4-2 Imagen SENose e interface.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 4-3 Patrón de respiración en suelo contaminado.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5-1 Potencial redox a lo largo del tratamiento.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 5-2 Potencial redox en los tratamientos de bioestimulación.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 5-3 Potencial de hidrógeno a lo largo del tratamiento.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 5-4 Conductividad a lo largo del tratamiento.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 5-5 Número de bacterias heterótrofas a lo largo del tratamiento.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 5-6 Número de bacterias hidrocarburoclas a lo largo del tratamiento.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 5-7 Porcentaje de degradación en los microcosmos.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 5-8 Patrón de emisión de Alcohol en los microcosmos.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 5-9 Patrón de emisión de Amoníaco en los microcosmos.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 5-10 Patrón de emisión de Óxidos de Nitrógeno.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 5-11 Patrón de emisión de Sulfuro de Hidrógeno en los microcosmos.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 5-12 Patrón de emisión de Monóxido de Carbono en los microcosmos.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 5-13 Patrón de emisión de Metano.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 5-14 Análisis multidimensional para la primera detección de gases (día 41).....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 5-15 Análisis multidimensional para la segunda detección de gases (día 43).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 5-16 Análisis multidimensional para la tercera detección de gases (día 90).....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 6-1 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Atenuación Natural.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 6-2 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioaumentación.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 6-3 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioaumentación con surfactante.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 6-4 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioestimulación.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 6-5 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioestimulación con surfactante.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 6-6 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioestimulación con surfactante y D-limoneno.....</i>	<i>79</i>

# Lista de tablas

	Pág.
<i>Tabla 3-1</i> .....	22
<i>Tabla 3-2</i> .....	23
<i>Tabla 3-3</i> .....	24
<i>Tabla 4-1</i> .....	28
<i>Tabla 4-2</i> .....	29
<i>Tabla 4-3</i> .....	30
<i>Tabla 5-1</i> .....	45
<i>Tabla 5-2</i> .....	47
<i>Tabla 5-3</i> .....	49
<i>Tabla 5-4</i> .....	63
<i>Tabla 5-5</i> .....	63
<i>Tabla 5-7</i> .....	64
<i>Tabla 5-8</i> .....	64
<i>Tabla 5-9</i> .....	64
<i>Tabla 5-10</i> .....	66
<i>Tabla 5-11</i> .....	67
<i>Tabla 5-12</i> .....	68
<i>Tabla 6-1</i> .....	73
<i>Tabla 6-2</i> .....	75
<i>Tabla 6-3</i> .....	75
<i>Tabla 6-4</i> .....	75
<i>Tabla 6-5</i> .....	75
<i>Tabla 6-6</i> .....	75
<i>Tabla 6-7</i> .....	76
<i>Tabla 6-8</i> .....	76
<i>Tabla 6-9</i> .....	76
<i>Tabla 6-10</i> .....	76
<i>Tabla 6-11</i> .....	76

## Lista de abreviaturas

**CMC:** Concentración Micelar Crítica

**C:N:P:** Proporción molar de Carbono, Nitrógeno y Fósforo

**DAMA:** Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura

**HAP:** Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos

**HTP:** Hidrocarburos Totales del Petróleo

**kg:** Kilogramo

**mg:** Miligramo

**pH:** Potencial de Hidrógeno

**ppm:** Partes por millón

**UFC/g:** Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo



# Introducción

En el año 1970 se creía que el suelo tenía una capacidad de autodepuración casi infinita motivo por el cual no se hablaba de contaminación de suelos, sin embargo en el año 1972 se clasificó al suelo como un recurso limitado y con facilidad de destruirse por lo que debe ser protegido. A través del tiempo las acciones tomadas para la protección del suelo aumentaron, en la Cumbre de Río "se reconoció la importancia de la protección del suelo y de sus usos potencial en el contexto de desarrollo sostenible" (Silva Arroyave & Correa Restrepo, 2009), en 1994 la Convención de las Naciones Unidas estableció como objetivo "evitar y reducir la degradación del suelo" (Silva Arroyave & Correa Restrepo, 2009). En Colombia uno de los contaminantes sobresalientes son los hidrocarburos, los cuales han causado contaminación tanto en el suelo como en fuentes hídricas afectado a la población aledaña. La contaminación por hidrocarburos en la mayoría de los casos se da por fuentes antrópicas entre las que se encuentran atentados contra oleoductos, pozos, líneas de transferencia, equipos de producción, mantenimiento y transporte de crudo (Ecopetrol. S.A, 2015a), además de la instalación de válvulas ilícitas y residuos provenientes de la refinación del petróleo (Ecopetrol. S.A, 2015b).

Los hidrocarburos tienen una baja solubilidad en agua y son altamente hidrofóbicos por lo cual se adhieren a las partículas del suelo además de ser persistentes en el medio ambiente (B. V. Chang, Chang, & Yuan, 2003; Li, Wong, Wang, & Tam, 2015). Algunos hidrocarburos presentan propiedades cancerígenas, mutagénicas o son posibles disruptores endocrinos, disminuyen el crecimiento e interfieren con el desarrollo normal de flora y fauna (Kauppi, Sinkkonen, & Romantschuk, 2011; Li, Wong, & Tam, 2010), por este motivo la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) ha clasificado a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) como contaminantes prioritarios (Wu et al., 2016). En Colombia, el Ministerio de Ambiente Desarrollo Sostenible ha establecido que los hidrocarburos son compuestos tóxicos (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial & Colombia, 2007). La resolución 1170 de 1997 del DAMA dicta normas que pretenden disminuir los vertimientos de hidrocarburos al suelo sin embargo a nivel general la legislación que regula el vertimiento de compuestos tóxico al suelo en esta país es poco estricta.

Una alternativa para la descontaminación de suelos es la biorremediación, la cual es una tecnología eficiente, amigable con el medio ambiente y económica en comparación con los métodos físicos y químicos. Alrededor del mundo se han aplicado tratamientos de bioestimulación y bioaumentación para tratar suelos contaminados con hidrocarburos obteniendo diferentes porcentajes de biodegradación según las condiciones. La

bioestimulación se caracteriza por modificar el ambiente debido a la adición de nutrientes con lo que se evade las limitaciones metabólicas de las comunidades microbianas (Wu et al., 2016). Nutrientes como nitrógeno, fósforo y aceptores de electrones son empleados para estimular la velocidad de degradación del contaminante (Hatzikioseyan, 2010). Además de la adición de enmiendas como melaza, surfactantes como el Tween 80, solubilizantes como D-Limoneno y Leonardita los cuales actúan como co-sustrato, aumentar la biodisponibilidad del contaminante y mejorar las condiciones fisicoquímicas del suelo respectivamente. Por otro lado la bioaumentación consiste en aumentar la biomasa de la población bacteriana (Xu & Lu, 2010) mediante la inoculación de microorganismos alóctonos para mejorar la biodegradación de los contaminantes (Hatzikioseyan, 2010; Wu et al., 2016). La introducción de microorganismos no reemplaza la población microbiana autóctona (Hatzikioseyan, 2010).

El objetivo de esta investigación se centró en evaluar el efecto del surfactante Tween 80 en la degradación de HTP en los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación de suelos contaminado con crudo en condiciones anaerobias. Se usó un diseño estadístico completamente al azar con un factor y 7 niveles que corresponden a los tratamientos Control (C), Atenuación Natural (AT), Bioaumentación (B), Bioaumentación con surfactante (BS), Bioestimulación (BE), Bioestimulación con surfactante (BES) y Bioestimulación con surfactante y D-limoneno (BESL). La dosificación de nutrientes en los tratamientos de bioestimulación fue realizada mediante el método de McCarty. En los tratamientos de Bioaumentación se agregó el 10% de compost con el fin de no diluir los hidrocarburos en el suelo contaminado. La duración de los tratamientos fue de 90 días. Se realizó la caracterización fisicoquímica del suelo y cuantificaron los HTP en todos los tratamientos al inicio y al final de los tratamientos. El crecimiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas fue realizado cada 7 días al igual que los parámetros como potencial redox, potencial de hidrógeno y conductividad eléctrica. Adicional a esto se realizó un patrón de emisión de gases generados en el proceso de biorremediación en condiciones anaerobias. Se encontró que la adición de nutrientes, enmienda y compost mejoraron el porcentaje de biodegradación de HTP en contraste con el tratamiento de Atenuación Natural e investigaciones previas.

El primer capítulo de la presente investigación contiene el planteamiento del problema en donde se da a conocer el impacto que tienen el crudo en el medio ambiente, las fuentes de contaminación y la posible solución. Además se mencionan el objetivo general, los objetivos específicos, la pregunta de investigación y la hipótesis de esta investigación. En el segundo capítulo se presentan los antecedentes relacionados con la biorremediación de diferentes hidrocarburos en condiciones. En el tercer capítulo se describe el marco teórico que se relaciona con el proceso de biorremediación, variables que intervienen en el proceso y las características de las enmiendas a utilizar. En el cuarto capítulo se presenta la metodología usada en la ejecución de la investigación. En el quinto capítulo da a conocer la discusión y los resultados obtenidos en el proceso de biorremediación teniendo en cuenta los análisis estadísticos. En el último capítulo se presentan las conclusiones y recomendaciones de esta investigación.

# 1. Antecedentes

En el presente capítulo se presenta una revisión sobre trabajos previos en el tema de la biorremediación de sistemas anaerobios de suelos y sedimentos llevados a cabo a escala de laboratorio.

Dell'Anno, Beolchini, Rocchetti, Luna, & Danovaro (2012) investigaron el cambio en la abundancia y biodiversidad de los microorganismos durante pruebas de biorremediación y la degradación de hidrocarburos totales del petróleo. Se estudió la evolución del ecosistema microbiano. La investigación se realizó en sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos en condiciones anaerobias a 20°C y 35°C durante 60 días. Se agregó lactosa y acetato de sodio como donantes de electrones. Se encontró que los mejores resultados se presentaron a 35°C. La concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) con adición de acetato se redujo de  $1125 \pm 125 \mu\text{g/g}$  a  $646 \pm 71 \mu\text{g/g}$  mientras que en la muestra con lactosa la reducción fue de  $1100 \pm 25 \mu\text{g/g}$  a  $628 \pm 60 \mu\text{g/g}$ . Beolchini, Rocchetti, Regoli, & Dell'Anno (2010) estudiaron el proceso de biorremediación en sedimentos marinos, sin embargo, estos se encontraban contaminados con hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAP), la concentración de estos fue de  $500 \pm 20 \mu\text{g/g}$  y  $6.1 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  respectivamente. Se aplicaron tres tratamientos, al primero se le adicionó sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y fosfato di potásico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  como nutrientes, al segundo tratamiento se le adicionó arena y al tercero una combinación de nutrientes y arena. Los mejores resultados se vieron en el tercer tratamiento con una remoción de hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos poli cíclicos cerca del 75%. Coates, Woodward, Allen, Philp, & Lovley (1997) investigaron la biodegradación de HAP en sedimentos marinos, específicamente naftaleno, fenantreno, metilnafataleno, fluoreno y fluoranteno, encontrando que estos fueron degradados rápidamente a dióxido de carbono. Coates, Anderson, & Lovley (1996) estudiaron la biodegradación de HAP en sedimentos marinos bajo condiciones sulfato reducidas con una duración de 70 días. Se determinó que las velocidades de degradación estaban relacionadas con la concentración de hidrocarburos. El naftaleno y fenantreno fueron oxidados a  $\text{CO}_2$  y además se descubrió que el benceno no era oxidado inmediatamente a  $\text{CO}_2$ .

Coates, Anderson, Woodward, Phillips, & Lovley (1996) estudiaron la degradación bajo condiciones anaerobias en sedimentos marinos con adición de Hierro (III). Se determinó

que en estas condiciones no se favorecía la biodegradación y que esta puede tener mejores resultados bajo condiciones sulfatos reducidas. Boopathy (2003a) investigó la biodegradación de diésel en condiciones anaerobias en sedimentos recogidos en humedales. Se realizó en una mezcla de aceptores de electrones donde se tuvo un biodegradación del 99%, en condiciones sulfato reducidas un 62%, un 43 % bajo condiciones metanogénicas y 40% en condiciones nitratos reducidos. B. V. Chang et al (2003) estudiaron dos muestras de lodo, uno local y otro proveniente de la actividad petroquímica, las cuales estaban contaminadas con HAP. Las condiciones de degradación que se probaron en este estudio fueron sulfato reducido, metanogénicas y nitrato reducidas, obteniéndose velocidades de degradación mayor en el orden expuesto.

Li et al (2010) realizaron una investigación en sedimentos de manglar contaminados con HAP, específicamente fluoreno, fenantreno, fluorantreno y pireno bajo dos condiciones, sin oxígeno y con una baja concentración de este, donde se realizó una inoculación con bacterias degradadoras en las dos condiciones. Se encontró que la mayor biodegradación fue en la muestra inoculada. La presencia de hierro (III) no mejoró la biodegradación de manera significativa, además se halló que la biodegradación de los HAP estuvo en los rangos de 4% a 15% y que los hidrocarburos de bajo peso molecular como fluoreno y fenantreno tuvieron una biodegradación más rápida que las moléculas de alto peso molecular como fluorantreno y pireno, esta biodegradación se vio optimizada bajo condiciones de bajo oxígeno. Li et al (2015) bajo condiciones similares a las anteriores y variando el aceptor de electrones a bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) obtuvieron resultados similares a los anteriores. Li, Zhou, Wong, & Tam (2009) en sedimentos de manglar contaminados con HAP específicamente fluoreno, fenantreno, fluorantreno y pireno en presencia de aceptores de electrones y en condiciones de ausencia de oxígeno y poco contenido del mismo. Se investigó la influencia de la profundidad sobre la biodegradación. Al final del proceso de biorremediación se encontró que en bajas condiciones de oxígeno el porcentaje de biodegradación fue del 33% para el fluoreno, 24% para el fenantreno, 22% para el fluorantreno y 17% para el pireno. Mientras que en condiciones sin oxígeno los resultados fueron los siguientes: 24% para el fluoreno, 23% para el fenantreno, 12% para el fluorantreno y 10% para el pireno. B.-V. Chang, Chang, & Yuan (2008) investigaron la biodegradación de HAP, concretamente fenantreno y pireno en sedimentos de manglar. Se tomaron cinco muestras a las cuales se adicionó acetato, lactato, piruvato, cloruro de sodio, celulosa o hierro cero valente, donde se encontró que todas optimizaban el proceso de biodegradación. Además, se determinó que la inoculación de las muestras favorecía la biodegradación de HAP. También pudo observarse que la velocidad de degradación del fenantreno fue mayor a la del pireno, esto debido a su mayor peso molecular.

Scherr, Nahold, Lantschbauer, & Loibner (2011) investigaron la biorremediación en suelos. En este estudio se proponen la aplicación secuencial de donadores de electrones con el fin de degradar compuestos como percloroetano, dicloroetano y cloruro de vinilo. Después de 35 días, se observó una degradación del 99.9% del percloroetano, mientras que el dicloroetano se degradó completamente en 15 días, lo que demuestra la eficiencia

de la aplicación secuencial de donadores de electrones ya que estos aceleran la transferencia de electrones y facilita la reacción redox. Boopathy (2003b) se investigó la biodegradación de diésel número 2 en condiciones anaerobias mediante el uso de reactores de suspensión. Se evaluó la biodegradación del hidrocarburo por bacterias metanogénicas, sulfato- nitrato reducción y con una mezcla de aceptores de electrones. Se encontró que después de 290 días, la mayor biodegradación se dio con la mezcla de aceptores de electrones con un porcentaje de 80.5% seguida por las condiciones sulfato reducidas con un 55%, luego un 50% de reducción en condiciones nitrato reducidas, un 40% bajo condiciones metanogénicas y 27% para el control. Boopathy (2004) evaluó la biodegradación de diésel número 2 en las siguientes condiciones anaeróbicas: sulfato reducidas, nitrógenos reducidos, metanogénicas y mezcla de aceptores de electrones para un suelo contaminado en presencia de bacterias nativas. Donde los resultados obtenidos fueron similares a los presentados en la investigación anterior, encontrándose una degradación mayor con la mezcla de aceptores de electrones cuyo porcentaje de degradación llegó al 88%, seguidas de las condiciones sulfato reducidas con un 61%, luego las nitrato reducidas con un porcentaje igual a 53% y finalmente en condiciones metanogénicas con un 44%.

B. V. Chang, Shiung, & Yuan (2002) estudiaron muestras de suelo contaminado con HAP a los que se les agregó nutrientes como acetato, lactato y piruvato mediante pulsos. Al mismo tiempo estas muestras fueron inoculadas con bacterias extraídas de lodo proveniente de una refinería con historial de contaminación. Se encontraron que las velocidades de degradación en orden descendente se presentaban en las condiciones sulfato reducido, metanogénicas y nitrato reducidas para los hidrocarburos fenantreno, pireno, antraceno, fluoreno y acenapteno. Ambrosoli, Petruzzelli, Luis Minati, & Ajmone Marsan (2005) observaron que la biodegradación de HAP era favorecida por la adición de fuentes de carbono como glucosa y acetato que favorecen el co-metabolismo. DOU, LIU, & HU (2008) al igual que en la investigación anterior encontraron que la adición de acetato de sodio favorecía las velocidades de degradación además de encontrar que la concentración de contaminante en la muestra presenta gran relevancia en la biodegradación y que a mayor concentración la degradación es más lenta y puede inhibirse. Grishchenkov et al (2000) también realizaron una investigación en suelo contaminado con alcanos e HAP, donde se obtuvo una degradación que oscila entre el 20-25% de algunos alcanos y entre el 15-18% para HAP. En esta investigación los resultados de la biodegradación no fueron tan altos como los mostrados anteriormente.

Chen, Barker, & Gui (2008) estudiaron la biodegradación en una muestra de agua y arena subterráneas a las cuales se las contaminó con BTEX y dos cantidades de etanol. Se encontró que la biodegradación del benceno fue más rápida en condiciones de hierro reducción pero teniendo en cuenta que el etilbenceno fue removido en condiciones nitrato reducidas, este hidrocarburo pudo haber inhibido la biodegradación de este. (Siddique, Fedorak, & Foght (2006) realizaron un proceso de biodegradación de n- alcanos de bajo peso molecular bajo condiciones metanogénicas usando desechos procedentes de la producción de crudo (arenas bituminosas) en Canadá. Se encontró que bajo estas condiciones y después de 25 semanas, el primer hidrocarburo en

biodegradarse fue el C10 llegando al 100% de degradación, seguido del C8 con un 97%, C7 con 74% y C6 con un 44%. Cai et al (2015) investigaron los procesos de biorremediación en agua contaminada, encontrándose que los primeros hidrocarburos en biodegradarse fueron los n-alcanos lo cuales se biodegradaron en un 100% al igual que los hidrocarburos mono aromáticos lineales de cadena larga y estos se degradaron preferencialmente que los HAP lo cual demuestra que la tasa de biodegradación disminuye con el aumento del número de carbono.

La biodegradación de hidrocarburos en agua también ha sido estudiada, por ejemplo (Folwell, McGenity, Price, Johnson, & Whitby (2016) tomaron una muestra de agua producto del lavado de arenas bituminosas contaminadas con HAP y ácido naftalénico en condiciones metanogénicas y sulfato reducidas. Se encontró que el 2-metilnaftaleno al final del proceso fue degradado en un 40%  $\pm$  7.89 en condiciones sulfato reducidas y en un 25%  $\pm$  8.21 en condiciones metanogénicas. Bento, Camargo, Okeke, & Frankenberger, William (2005) realizaron diferentes tratamientos de bioestimulación, bioaumentación y atenuación natural en dos suelos contaminados con diésel durante un periodo de doce semanas, donde se analizaron las fracciones livianas y pesadas del diésel. En el primer suelo se encontró que la velocidad de degradación fue más alta para las fracciones livianas de los HTP obteniéndose una degradación del 72% después de seis semanas para el tratamiento de bioestimulación. Para el segundo suelo se observó un aumento en el porcentaje de degradación a través del tiempo, en este suelo el mayor porcentaje de degradación se dio en el tratamiento de atenuación natural llegando a un 47% en las fracciones livianas.

Kauppi et al (2011) realizan una comparación entre dos tratamientos de biorremediación correspondientes a bioestimulación y bioaumentación. El suelo tratado en esta investigación fue contaminado con diésel, posteriormente se almacenó durante un año en donde se le suministró aire. Para el tratamiento de bioestimulación los nutrientes empleados fueron urea y urea metileno como fuente de nitrógeno, además de bifosfato de sodio y fosfato ácido como fuente de fósforo, también se adicionaron virutas de madera como material de soporte y mejorar la aireación en el suelo. Para la bioaumentación se procedió a aumentar la densidad bacterial encontrándose los mejores resultados en el tratamiento de bioestimulación con aireación mientras que en el tratamiento de bioaumentación no se obtuvo una degradación significativa. Lladó, Solanas, Lapuente, Borràs, & Viñas (2012) también evaluaron dos procesos de biorremediación, bioestimulación con nutrientes inorgánicos, bioestimulación con biosurfactante, bioaumentación con microorganismos degradadores de hidrocarburos y bioaumentación con hongos degradadores de hidrocarburos en un suelo contaminado con aceite mineral. Los tratamientos se llevaron a cabo durante 200 días donde se observó un porcentaje de degradación entre el 30% y el 50% en todos los tratamientos, sin embargo el mayor porcentaje se obtuvo en el proceso de bioaumentación con hongos degradadores de hidrocarburos. Wu et al. (2016) emplearon tratamientos de bioestimulación y bioaumentación esta vez en un suelo contaminado con crudo donde se usaron  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fuentes de nitrógeno y fósforo respectivamente para el

primer tratamiento y *Acinobacter* SZ-1 para el tratamiento de bioaumentación. Se encontró que después de 6 semanas, tiempo en que finalizó el experimento, el porcentaje de degradación fue de 60% para el tratamiento de bioestimulación y de un 34% para el tratamiento de bioaumentación. Xu & Lu (2010) encontraron resultados similares a la anterior investigación. Ellos trataron un suelo contaminado con crudo bajo los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación, donde encontraron eficiencias de remoción del 26% para el tratamiento de bioestimulación, 27% para el tratamiento de bioaumentación, 38% para el tratamiento de bioestimulación más material de soporte y sin inmovilización de células y un 61% de remoción para el tratamiento de bioaumentación con material de soporte e inmovilización de células. Suja et al (2014) realizaron tratamientos de bioestimulación y bioaumentación; en el primer tratamiento se agregó  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fuente de nitrógeno,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como fuente de fósforo y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fuente de potasio para conseguir una relación molar de 100:10:1:3 correspondiente a C:N:P:K y en el segundo tratamiento se evaluaron tres consorcios microbianos (MC1, MC2, MC3) por separado. Se encontró que a escala de laboratorio la degradación de todos los consorcios fue mayor al 80% mientras que a escala de campo dos consorcios (MC2 y MC3) mostraron una degradación superior al 90% y el consorcio MC1 presentó una degradación del 72.94%. Los resultados muestran que la combinación de nutrientes con adición del consorcio microbiano MC3 mejora la eficiencia de remoción.

Jiang et al (2016) realizaron una investigación en dos suelos (A y B) contaminados con hidrocarburos, las concentraciones fueron de 22700 mg/kg y 31500 mg/kg respectivamente. Se emplearon tratamientos de bioestimulación y un tratamiento conjunto de bioestimulación. En el primero de ellos se añadió nitrato de amonio y orto fosfato de potasio. En la bioaumentación se usó *Pseudomona* sp y *Klebsiella* sp. En el tratamiento de bioestimulación en el suelo A se obtuvo una degradación de 84% y 91% para las fracciones alifáticas y aromáticas respectivamente. En el tratamiento combinado se tuvieron porcentajes de degradación de 75% y 93% para las fracciones ya mencionadas. En el suelo B el tratamiento de bioestimulación obtuvo una degradación de 92% y 93% para las fracciones alifáticas y aromáticas respectivamente. En el tratamiento combinado se tuvieron porcentajes de degradación de 94% y 92% para las fracciones ya mencionadas. Nikolopoulou et al (2013) realizan tratamientos de bioestimulación y bioaumentación con microorganismos autóctonos en agua de mar durante 60 días. Se adicionó un fertilizante lipofílico combinado con un biosurfactante para mejorar el proceso de biorremediación. Se aplicaron 3 tratamientos de bioestimulación: agua de mar + crudo, agua de mar + crudo +  $\text{KNO}_3$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (NPK) y agua de mar + crudo + ácido úrico, lecitina y biosurfactante (ULR). Se aplicaron 3 tratamientos de bioaumentación autóctona: agua de mar + crudo +  $\text{KNO}_3$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + microorganismos autóctonos pre adaptados. (NPKM), agua de mar + crudo +  $\text{KNO}_3$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + biosurfactante + microorganismos autóctonos pre adaptados (NPKMR) y agua de mar + crudo + ácido úrico + lecitina+ biosurfactante + microorganismos autóctonos pre adaptados. (ULRM). Se determinó que la adición de biosurfactante incrementa la biodisponibilidad del hidrocarburo, pero la actividad microbiana sigue limitada por la escasez de nutrientes. La adición de biosurfactante aceleró la biodegradación en los tratamientos con

bioaumentación autóctona, (ULRM y NPKMR) y el tratamiento de bioestimulación (ULR). Hickey, Gordon, Dobson, Kelly, & Doyle (2007) evaluaron la degradación de fluorantreno empleando dos surfactantes, Tween 80 y JBR en presencia de pseudomonas. Se encontró que ambos surfactantes mejoraron la degradación del HAP. Se determinó que la pseudomona fue capaz de usar los surfactantes como sustratos para el crecimiento. El surfactante JBR aumentó la desorción del fluorantreno de la matriz del suelo y la velocidad de degradación. Manresa, Solanas, Sabate, Viñas, & Abalos (2004) evaluaron el efecto de un biosurfactante en la biodegradación de hidrocarburos. Se empleó un consorcio microbiano en la investigación. Se encontró que la adición de biosurfactante aceleró la biodegradación de los hidrocarburos de un 32% a un 61% en 10 días de incubación. En las fracciones alifáticas la biodegradación incrementó de 16% a 70% y en los HAP de 9% a 44%.

Atagana, Haynes, & Wallis (2003) investigaron el efecto de 5 surfactantes, Arkopal-N-060, Arkopal-N-080, Arkopal-N-100, Hosaf-541-KS y Tween-80 en un suelo contaminado con creosota. La contaminación inicial del suelo era de 250.000 mg/ kg. La concentración de los surfactantes fue de 0.01, 0.1, 0.35, 0.5 y 1.0 % (v/v). Se observó que ninguna concentración inhibió el crecimiento de microorganismo. Los mejores resultados se encontraron a la concentración de 0.5% en el siguiente orden, Arkopal-N-060, Hosaf-541-KS, Arkopal-N-080, Tween-80 y Arkopal-N-100. Chu & Kwan, (2003) evaluaron la desorción que producen tres surfactantes (Brij 35, Tween 80, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)) junto con tres solventes orgánicos (acetona, trietilamina, escualeno) en tres suelos con características de desorción diferentes. El suelo contiene 4,4'-diclorobifenil (DCB). La mejora en el proceso puede ser debido a la mejor disolución de contaminante en el solvente y a la formación de micelas. Se encontró que la mezcla de acetona con cualquiera de los tres surfactantes mejora la extracción de DCB de 15 – 25% comparado con el uso de los surfactantes solos. En la combinación de acetona con los tres surfactantes se encontraron mejores resultados se dieron con la mezcla de acetona y Brij 35 con rangos de 14 a 18% de desorción. En la combinación de trietilamina con los tres surfactantes se encontraron mejores resultados se dieron con Brij. Se observó que el porcentaje de recobro de DCB es inversamente proporcional al contenido de carbono orgánico en el suelo. Se encontró que el contenido de carbono orgánico en el suelo es muy importante, al igual que la polaridad del solvente. Si la polaridad del solvente es muy baja se crean emulsiones estables. Lee, Kang, & Do (2005) lavaron en un suelo contaminado con diésel con sorbitan monooleate. La prueba se hizo a escala piloto con dimensiones de 4m \* 4m \* 4m. El suelo tiene una composición heterogénea. Se encontró que la concentración de HTP fue 200 veces más alta en el lavado con la mezcla de surfactante que la realizada con agua. La concentración de HTP en el suelo era de 20.000 mg/kg. Se evaluaron tres combustibles, gasolina, diésel y querosene en diferentes porcentajes de surfactante de 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0%. Se encontró que la masa de HTP removida con el surfactante fue 75 veces mayor que la removida solo con agua.

Khalladi, Benhabiles, Bentahar, & Moulai-mostefa (2009) evaluaron el proceso de lavado de un suelo contaminado con diésel usando un surfactante iónico, Sodium Dodecyl



Sulfate (SDS). Se determinó que se necesita un tiempo de contacto para que el surfactante sea eficiente. En el proceso se removi6 el 97% de di6sel. Liu, Jacobson, & Luthy (1995) evaluaron la biodisponibilidad de naftaleno y su degradaci6n con microorganismo. La evaluaci6n se realiza en desechos y suelo. Se emplearon dos surfactantes no i6nicos, Brij 30 y Triton X-100. Se encontr6 las concentraciones superiores a la concentraci6n micelar cr6tica no es toxica para las bacterias y que la presencia de micelas no inhibe la mineralizaci6n del naftaleno. Se encontr6 no hay diferencias estructurales en las bacterias que crecieron en presencia de surfactante y las que no lo hicieron. Se encontr6 que el surfactante Brij 30 fue biodegradado junto con el naftaleno mientras el surfactante Triton X-100 no se degrad6. Kim, Park, & Kim (2001) investigaron el efecto de tres surfactantes no i6nicos, Triton X-100, Tween 80 y Brij 30, en la biodegradaci6n de HAP, naftaleno y fenantreno, en fase acuosa y en lodo. Se determin6 que debajo de la concentraci6n cr6tica micelar los surfactantes existen como mon6meros y no contribuyen a la solubilizaci6n de los HAP y que encima de la concentraci6n cr6tica micelar los surfactantes forman micelas y mejoran la solubilidad de HAP. Se encontr6 que el surfactante m6s biodegradable fue Brij 30 y que no mostr6 inhibici6n para el crecimiento de bacterias a una concentraci6n de 1.5 g/l. Se determin6 que el surfactante Tween 80 no presenta efectos t6xicos para los microorganismos. Se determin6 que el surfactante Brij 30 fue usado como fuente de carbono para las bacterias. Se estableci6 que el naftaleno y el fenantreno fueron completamente degradados. Zhang & Zhu (2012) investigaron la sorci6n y la biodegradaci6n de pireno por parte de la bacteria *Klebsiella oxytoca* PYR-1 en presencia de un surfactante no i6nico, Tween 80. Se encontr6 que el surfactante promueve la sorci6n, remoci6n y biodegradaci6n de pireno. En la concentraci6n cr6tica micelar del surfactante se dieron los mejores resultados de biodegradaci6n. La mejora fue del 22.4%.



## 2.Planteamiento del problema

En este capítulo se presenta el problema a investigar y se da a conocer los objetivos e hipótesis que se desarrollaran a lo largo de la investigación.

El crudo es una mezcla multicomponente formada principalmente de hidrocarburos entre ellos hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAP). Estos son compuestos orgánicos constituidos por anillos aromáticos (Mastandrea et al., 2005), son moléculas grandes y por su estructura son difíciles de romper ya que poseen una alta resonancia. Los hidrocarburos poseen una baja solubilidad y son altamente hidrofóbicos por lo cual se adhieren a las partículas del suelo, plumas, pelaje y escamas y son persistentes en el medio ambiente (B. V. Chang et al., 2003; Li et al., 2015). Algunos de estos hidrocarburos presentan propiedades cancerígenas, mutagénicas o son posibles disruptores endocrinos, además disminuyen el crecimiento e interfieren con el desarrollo normal de flora y fauna (Kauppi et al., 2011; Li et al., 2010), por esto Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) ha clasificado a los HAP como contaminantes prioritarios (Wu et al., 2016). En Colombia, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible ha establecido que los hidrocarburos son compuestos tóxicos (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial & Colombia, 2007).

Se puede encontrar hidrocarburos en el suelo producto de fuentes antrópicas entre las que se encuentran atentados contra oleoductos, pozos, líneas de transferencia, equipos de producción, mantenimiento y transporte de crudo (Ecopetrol. S.A, 2015a), además de la instalación de válvulas ilícitas y residuos provenientes de la refinación del petróleo (Ecopetrol. S.A, 2015b). De acuerdo a la revista **e+**, los atentados contra la infraestructura petrolera empezaron en los años 80, y para el 2015 el número de atentados superan los 2.500 (Ecopetrol. S.A, 2015c). En un artículo de la misma revista se dice “Las válvulas ilícitas, que alimentan el negocio del narcotráfico se han convertido en un problema tan grave como el de las voladuras por atentados. Parches negros de crudo sobre la vegetación y los ríos manchan el paisaje de esta zona del Pacífico nariñense.”(Ecopetrol. S.A, 2015d) Estas fuentes de contaminación antrópicas afectan la salud humana y el medio ambiente. En este caso se habla puntualmente del suelo, el cual es un proveedor de servicios ambientales como la generación de alimentos y producción de biomasa, almacenaje de minerales, materia orgánica y agua, filtración de aguas subterráneas, es hábitat y reserva genética, entorno físico y cultural para la humanidad y es fuente de materia prima (Silva Arroyave & Correa Restrepo, 2009).

Para eliminar este tipo de compuestos del suelo ha surgido la biorremediación como un tratamiento efectivo, económico y versátil (Jiang et al., 2016; Nikolopoulou et al., 2013; Xu & Lu, 2010). La biorremediación en condiciones anaeróbicas es eficaz a la hora de remover HAP ya que puede romper su compleja estructura.

## **2.1.      Pregunta de investigación**

- ¿Cómo varia la concentración de contaminantes recalcitrantes mediante la incorporación de un surfactante a la biorremediación de suelo contaminado con crudo en tratamientos de bioestimulación y bioaumentación en condiciones anaeróbicas?

## **2.2.      Objetivo general**

Gestionar la biorremediación de un suelo contaminado con crudo de petróleo adicionando surfactante para dos tecnologías de bioestimulo y bioaumentación.

## **2.3.      Objetivos específicos**

- Determinar las fracciones de crudo presentes en el suelo antes del proceso de biorremediación.
- Identificar las características físicas y químicas del suelo empleado en el proceso de biorremediación.
- Monitorear la concentración de contaminantes recalcitrantes en los tratamientos con adición de surfactante a lo largo del proceso de biorremediación.
- Monitorear la concentración de contaminantes recalcitrantes en los diferentes tratamientos sin adición de surfactante a lo largo del proceso de biorremediación
- Diseñar un protocolo de gestión para suelos contaminados con crudo en condiciones anaerobias.

## **2.4.      Hipótesis**

- La adición de surfactante en todos los tratamientos (bioestimulación y bioaumentación) aumenta la tasa de biodegradación obteniéndose menores concentraciones de contaminantes recalcitrantes al final del proceso de biorremediación.

## **2.5. Alcances**

En la presente investigación se pretende evaluar el porcentaje de degradación los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación con y sin surfactante en suelo contaminado con crudo en condiciones anaeróbicas.

## **2.6. Justificación**

A pesar de que la economía colombiana no se basa únicamente en la industria petrolera, esta si construye un pilar importante para la economía ya que ocupa los primeros lugares en la generación de divisas (Aconcha et al.,2010). De acuerdo con el Ministerio de Minas y Energía las principales regiones petroleras son Los Llanos Orientales y el Magdalena, sin embargo no solo los únicos lugares donde hay pozos productores o atraviesan oleoductos. El departamento del Putumayo cuenta con 9 pozos productores donde el crudo producido es recolectado y llevado hacia el Oleoducto TransAndino cuyo destino final se encuentra en el puerto de Tumaco-Nariño.

Históricamente el departamento del Putumayo ha sido uno de los más golpeados por la violencia. Grupos armados como las FARC y AUC delinquirían en el departamento, estos grupos al margen de la ley ocasionaron un sin número de atentados contra la infraestructura petrolera generando impactos ambientales negativos que no solo afecta a medio físico y biótico sino también al medio social.

El petróleo es una mezcla de diferentes hidrocarburos entre los que se encuentran los hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAP) los cuales tienen propiedades cancerígenas, mutagénicas o son posibles disruptores endocrinos, disminuyen el crecimiento e interfieren con el desarrollo normal de flora y fauna (Kauppi et al., 2011; Li et al., 2010) por tal motivo la EPA los ha considerado como contaminantes prioritarios (Wu et al., 2016), además por sus propiedades físicas los hidrocarburos se adhieren a las partículas del suelo, pelaje, plumas y escamas de los animales. Dado a los impactos negativos que tienen los derrames de hidrocarburos en el ambiente es necesario implementar tecnologías que permitan reducir los impactos en las zonas afectadas. Una de las tecnologías que se vienen aplicando sitios contaminados es la biorremediación, la cual ha demostrado ser eficiente y presentar bajo costo comparada tratamientos físicos y químicos (Jiang et al., 2016; Nikolopoulou et al., 2013; Xu & Lu, 2010). Dentro de la biorremediación se pueden encontrar tratamientos de bioestimulación y bioaumentación (Dell'Anno et al., 2012), ambos tratamientos han reportado en la literatura altos porcentajes de biodegradación de hidrocarburos. Debido a la naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos, estos tienden a adherirse a la matriz de suelo por lo cual se han realizado diversos estudios con surfactantes que ayuden a solubilizar y a aumentar la biodisponibilidad de los mimos (Hickey et al., 2007).



## 3.Marco teórico

En este capítulo se presentan los conceptos teóricos asociados la investigación que presentan mayor relevancia y sirven para entender los fenómenos que ocurren durante el proceso de biorremediación.

### 3.1. El suelo

"El suelo puede ser definido como un cuerpo natural, engendrado de una mezcla variable minerales rotos y erosionados y el deterioro de materia orgánica que cubre la Tierra en una capa y que puede suministrar soporte mecánico y sustento para las plantas cuando contiene cantidades apropiadas de aire y agua " (Lyon & Buckman, 1943). La formación del suelo se da por procesos pedogenéticos donde intervienen el clima, material parental, organismos, relieve y tiempo; a estos se les denomina **Factores Formadores de Suelo** (Izquierdo Romero, 2013; Jaramillo, 2002; Lladó Fernández, 2012).

#### 3.1.1. Clima

Los componentes climáticos que más incidencia presentan en la evolución del suelo son la precipitación, la temperatura y el viento, este último en la medida que condicione los procesos de evaporación del agua. Tanto la temperatura como la precipitación influyen en gran medida en la alteración y transformación de los compuestos minerales. Las temperaturas bajas favorecen la meteorización física mientras las temperaturas altas favorecen la meteorización química. Por su parte el flujo de agua puede movilizar o eliminar componentes del suelo (Jaramillo, 2002).

#### **Material parental**

El material parental del suelo se compone por las materiales que dan origen al suelo, el material parental puede estar formado por saprolitos o sedimentos no consolidados de cualquier procedencia y composición. El material parental puede originarse a partir de las rocas de la corteza terrestre y pueden clasificarse dentro de tres grupos: ígneas, metamórficas y sedimentarias (Jaramillo, 2002).

**Rocas ígneas:** Las rocas ígneas se forman por la dinámica del magma, esto se puede dar por enfriamiento o por fragmentación. Las condiciones de enfriamiento determinan la textura de la roca y la fragmentación comprende los procesos de

transformación del líquido con burbujas de gas dispersas, un gas con gotas líquidas dispersas o partículas de sólido aisladas. De acuerdo a las condiciones de presión y temperatura de solidificación de la roca se pueden clasificar en Rocas intrusivas o plutónicas, Rocas extrusivas y Rocas hipoabisales. El primer subgrupo de rocas ígneas se solidifica a grandes profundidades y altas temperaturas lo que favorece la formación cristales grandes y bien definidos que ocupan todo el espacio disponible, esto se da debido a los cambios graduales en el proceso de enfriamiento. El segundo subgrupo se solidifica en la superficie terrestre lo que genera un enfriamiento rápido limitando la formación de cristales. El tercer subgrupo de rocas ígneas se solidifican en condiciones intermedias de profundidad en donde algunos minerales se encuentran bien definidos mientras otros no alcanzan a desarrollarse (Jaramillo, 2002).

**Rocas Sedimentarias:** Las rocas sedimentarias se forman por sedimentos no consolidados mediante litificación. Los sedimentos pueden ser productos de fragmentos de rocas erosionadas o de la precipitación de compuestos químicos o restos orgánicos. De acuerdo a la textura las rocas sedimentarias se pueden clasificar como rocas clásticas o rocas no clásticas. Las rocas clásticas se forman a partir de rocas o mineras preexistentes, este tipo de rocas presenta estratificación la cual depende de las condiciones de estratificación. Las rocas no clásticas se producen debido a la precipitación de productos químicos o por acumulación de residuos de organismos(Jaramillo, 2002).

**Rocas metamórficas:** Las rocas metamórficas se originan a partir de rocas preexistentes que han sido sometidas a altas presiones o temperatura y la acción de fluidos químicamente activos. Estos procesos causan alteración en las estructuras de las minerales originales produciendo un reordenamiento o segregación (Jaramillo, 2002). Los sedimentos no consolidados se pueden clasificar de acuerdo al tamaño de partícula en bloque, piedra, grava, gravilla, arena muy gruesa, arena gruesa, arena media, arena fina, arena muy fina, limo y arcilla (Jaramillo, 2002).

### 3.1.2. Organismos

La unidad básica de un organismo es la célula y es donde se llevan procesos químicos que configuran el metabolismo, hacen parte de este el anabolismo y el catabolismo, en el primero de ellos se sintetizan compuesto necesarios para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la célula mientras que en el segundo se produce ruptura de biomoléculas en compuestos más simples con el fin de liberar energía (Jaramillo, 2002). Según la fuente de energía que utilizan los organismos estos se puede agrupar en fotótrofos, litógrafos y organótrofos, los primeros usa la luz como fuente de energía, los segundos obtienen la energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos y el tercer grupo obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos. De acuerdo a la fuente de carbono que usan los organismos se pueden agrupar en autótrofos, estos emplean el dióxido de carbono y en heterótrofos que emplean



compuestos orgánicos preformados con el fin de obtener el carbono requerido. Otra forma de agrupar los organismos es según la posibilidad de subsistir en presencia de oxígeno, de acuerdo a esto los organismos se pueden agrupar en aeróbicos son los cuales requieren oxígeno para vivir, anaeróbicos son aquellos que no requieren oxígeno para vivir, microaerófilos son aquellos que crecen mejor en bajas concentraciones de oxígeno y anaeróbicos facultativos los cuales son activos en condiciones anaeróbicas o aeróbicas (Jaramillo, 2002).

### **3.1.3. Relieve**

El relieve puede considerarse como el conjunto de formas que se encuentran en la superficie terrestre. "Las formas y las dinámicas del relieve se definen en un entorno donde confluyen influencias climáticas y geológicas". El agua corriente y lluvia, la gravedad, el viento, el hielo, el oleaje, algunos organismos se denominan Agentes Modeladores del Relieve ya que son capaces de transportar, depositar y desprender material del terreno mientras que los procesos moldeadores del terreno son la meteorización, remoción, transporte y depositación.

La clasificación de los tipos de relieve se da de acuerdo a las escalas entre los que se tiene Megarrelieve que se refiere al relieve global o de escala continental, Macrorrelieve o relieves regionales, Mesorrelieves o relieves locales, Microrrelieve y Nanorrelieve (Jaramillo, 2002).

### **3.1.4. Tiempo**

"La edad del suelo se limita al tiempo durante el cual han actuado los procesos pedogenéticos (Jaramillo, 2002)". Para definir la edad del suelo se debe tener en cuenta la edad de las rocas que corresponde al periodo en el cual fueron formadas, esta edad es mucho mayor a la edad del suelo. La edad del material parental dependiendo si es un saprolito su edad es mucho menor a la edad de la roca original, si corresponde a un sedimento su edad concierne a la edad del depósito (Jaramillo, 2002). La edad del relieve generalmente posee mayor edad que el eso, sin embargo Porta et al (1994) dice que el tiempo cero de la pedogénesis es el momento en el cual se formó la superficie geomorfológica y que sobre esta evoluciona el suelo, luego estos tendrían la misma edad, según Jaramillo (2002) "se puede tener geoformas más jóvenes que los suelos que hay en ellas".

El suelo es un elemento dinámico y es la interfaz entre la atmósfera, litosfera, biosfera e hidrosfera; es un lugar de constante intercambio de materia y energía lo que lo hace de vital importancia para ciclos biogeoquímicos (Arrieta Ramírez, 2011). Además provee diversos servicios ambientales como generación de alimento y producción de biomasa, almacenaje de materia orgánica, agua y sustancias químicas, filtración de aguas subterráneas y transformación, hábitat y reserva genética, entorno físico y cultural para la humanidad y fuente de materia prima (Silva Arroyave & Correa Restrepo, 2009).

El suelo está conformado por partículas minerales, materia orgánica, organismos vivos, agua y aire, los cuales se encuentran en equilibrio dinámico (Izquierdo Romero, 2013; Lladó Fernández, 2012). En el suelo se pueden distinguir tres fases: líquida, sólida y gaseosa, las cuales se encuentran en diferentes proporciones dando lugar a diversos tipos de suelo (Lladó Fernández, 2012). La evolución del suelo ha dado como resultado la formación de perfiles en donde se puede distinguir estratos horizontales llamados horizontes los cuales poseen diferentes características físicas, químicas y biológicas (Arrieta Ramírez, 2011).

## **3.2. Petróleo crudo**

El petróleo se forma a partir de la degradación de la materia orgánica en condiciones anaeróbicas, alta temperatura, presión elevada y largos periodos de tiempo. El petróleo es una mezcla de compuestos orgánicos que se comportan de manera diferente de acuerdo a los rangos de temperatura y presión que se encuentren. Pueden estar en estado gaseoso, líquido, sólido o en una combinación de los tres (Ahmend, 2006).

### **3.2.1. Definición química**

Desde un punto de vista químico el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos naturales que se encuentran en diferentes proporciones (Ahmend, 2006; Paramo Carrillo, 1992), los cuales presentan contenido de sustancias orgánicas e inorgánicas conocidas como contaminantes del petróleo por las propiedades que le brindan, entre estas se encuentran el azufre, oxígeno, nitrógeno y trazas de metales como vanadio, hierro y níquel (Paramo Carrillo, 1992; Schlumberger Oilfield, 2016).

#### **Composición química**

##### **Hidrocarburos**

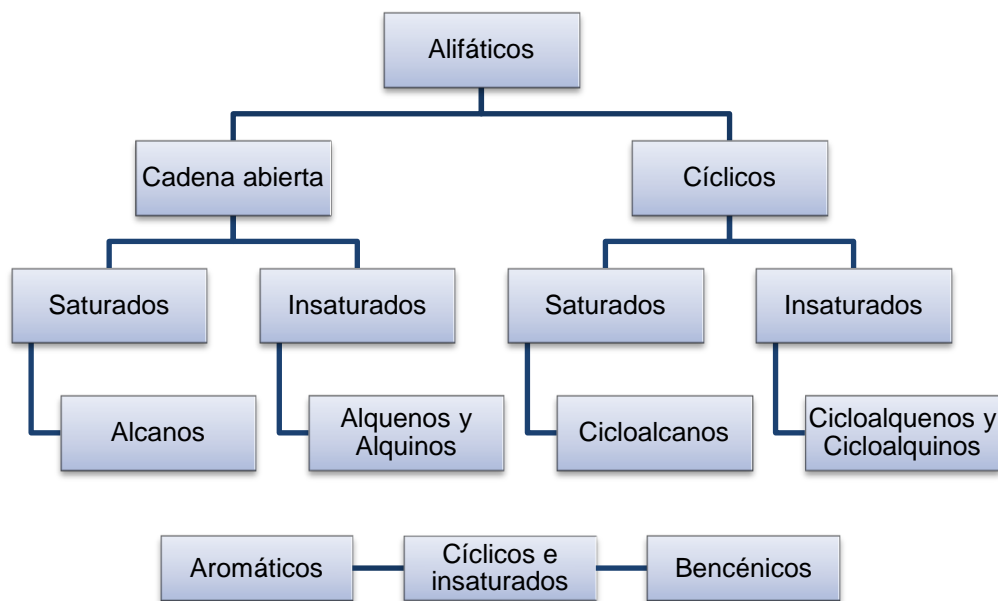
Los hidrocarburos son el principal componente de los crudos y su porcentaje varía entre el 90% y el 99%, el porcentaje restante está constituido por los contaminantes (Paramo Carrillo, 1992). Los hidrocarburos son compuestos orgánicos naturales o sintéticos que constan solo de átomos de carbono e hidrógeno (Paramo Carrillo, 1992; Turner, 2002). Los enlaces que poseen las moléculas de hidrocarburos son enteramente no polares, lo que les proporciona su falta de polaridad lo que les hace insolubles en agua aunque se disuelven bien en solventes no polares tales como el cloruro de carbono (Turner, 2002).

##### **Clasificación**

Los hidrocarburos presentan gran variación en comportamiento como en estructura, entre ellos se encuentran los hidrocarburos alifáticos que están compuestos por cadenas restas de átomos de carbono, en los hidrocarburos cíclicos los átomos de carbono

forman anillos mientras que los hidrocarburos aromáticos poseen en su estructura el anillo de benceno (Paramo Carrillo, 1992). Los hidrocarburos se pueden clasificar en varios grupos con características químicas similares como se muestra a continuación en la Figura 3-1.

**Figura 3-1** Hidrocarburos alifáticos y aromáticos



(Paramo Carrillo, 1992)

**Alcanos o parafínicos:** Son hidrocarburos lineales saturados que pueden estar ramificados o no, estos se caracterizan por los enlaces sencillos en su estructura y poseen como fórmula general  $C_nH_{2n+2}$ , para nombrar estos hidrocarburos se usan prefijos que indican el número de carbonos en la molécula y el sufijo ANO (Paramo Carrillo, 1992). Se tiene que los cuatro primeros miembros de estos hidrocarburos se encuentran en estado gaseoso a condiciones ambiente, del pentano al hexadecano se presentan como líquido a estas mismas condiciones mientras que a partir del hexadecano son semi-sólidos o sólidos (Paramo Carrillo, 1992). Estos hidrocarburos por ser saturados son químicamente inertes ante la mayoría de reactivos, estos poseen dos reacciones importantes como son la oxidación y la halogenación bajo condiciones intensas de luz solar o condiciones de luz ultra violeta (Paramo Carrillo, 1992).

**Ciclo-alcanos ciclo-parafínicos:** Son hidrocarburos cíclicos saturados que pueden estar ramificados o no, estos se caracterizan por los enlaces sencillos en su estructura y poseen como fórmula general  $C_nH_{2n}$ , para nombrar estos hidrocarburos se usan los mismo nombres que en los hidrocarburos alcanos con igual número de carbonos pero anteponiendo la palabra Ciclo y el sufijo ANO (Paramo Carrillo, 1992). Los dos primeros miembros son gases a condiciones ambientales,  $C_5$  al  $C_{15}$  son líquidos bajo estas condiciones y a partir de estos son sólidos (Paramo Carrillo, 1992). Estos hidrocarburos

son muy estables aunque reaccionan de más fácilmente que los alcanos, estos lo hacen por sustitución o por adición de acuerdo a las condiciones de la reacción o los catalizadores empleados (Paramo Carrillo, 1992).

**Alquenos u oleofínicos:** Son hidrocarburos lineales insaturados que pueden estar ramificados o no, estos se caracterizan por los enlaces dobles entre dos carbonos contiguos y poseen como fórmula general  $C_nH_{2n}$ , para nombrar estos hidrocarburos se usan prefijos que indican el número de carbonos en la molécula y el sufijo ENO (Paramo Carrillo, 1992). Se tiene que los tres primeros miembros de estos hidrocarburos se encuentran en estado gaseoso a condiciones ambiente, del  $C_5$  al  $C_{15}$  se presentan como líquido a estas mismas condiciones y a partir de aquí se presentan como sólidos (Paramo Carrillo, 1992). El punto de ebullición de estos hidrocarburos es ligeramente mayor al del alcano con el mismo número de carbonos sin embargo el punto de fusión baja considerablemente con respecto a los alcanos (Paramo Carrillo, 1992). Los Alquenos son muy reactivos debido a la presencia de doble enlace en su estructura, estos reaccionan fácilmente con oxidantes fuertes y pueden formar glicoles o compuestos halogenados además se polimerizan bajo condiciones especiales de presión, temperatura y catalizadores.

**Aromáticos:** Estos hidrocarburos están constituidos por benceno y sus derivados, se caracterizan por ser altamente insaturados con algunas propiedades físicas y químicas diferentes a los anteriores hidrocarburos cíclicos (Paramo Carrillo, 1992). La gran mayoría de estos hidrocarburos son líquidos a condiciones ambientales, ellos poseen un alto poder disolvente de grasas, resinas, asfaltos y fibras textiles (Paramo Carrillo, 1992). Los hidrocarburos aromáticos son muy reactivos químicamente dada su condición de insaturación (Paramo Carrillo, 1992). Los principales miembros de este tipo de hidrocarburos son el benceno, tolueno, xileno, etil-benceno, naftaleno, antraceno y fenantreno (Paramo Carrillo, 1992).

### 3.2.2. Definición física

Desde un punto de vista físico el petróleo se considera como un líquido inmiscible en agua, menos denso que la misma, visco y con propiedades como olor, color varían dependiendo de la era geológica en que fueron formados (Paramo Carrillo, 1992; Schlumberger Oilfield, 2016). Se sabe que crudos formados en el terciario y más recientes presentan color oscuro (negro) y poseen mal olor mientras que los crudos más antiguos o cretácicos presentan colores claros, entre verdes, anaranjados o rojizos y son inodoros (Paramo Carrillo, 1992).

## 3.3. Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que emplea el potencial de microorganismos y plantas para degradar contaminantes y transformarlos a formas menos tóxicas o

mineralizarlos (Arrieta Ramírez, 2011) con el fin de restaurar o rehabilitar sitios que han sido contaminados. Esta es una alternativa a los tratamientos físico-químicos dado que ha mostrado ser eficiente y económica (Dinwiddie, Terry, & Chen, 2014; Jiang et al., 2016; Xu & Lu, 2010). En ambientes contaminados con hidrocarburos la biorremediación ha resultado ser efectiva, presentar una relación costo-beneficio alto y es aplicable a áreas extensas (Bento et al., 2005; Jiang et al., 2016).

Las técnicas de biorremediación son aplicables en medio ambientes capaces de sostener vida. Los microorganismos solo atacan el contaminante si están disponibles compuestos que les ayuden a generar energía y nuevas células.

La biorremediación según Xu & Lu (2010) puede dividirse en dos estrategias que son biorremediación in-situ y biorremediación ex-situ.

### **3.3.1. Biorremediación in-situ**

En esta estrategia de biorremediación los tratamientos biológicos son aplicados sin remover el suelo o agua subterránea contaminada como ejemplo de esta estrategia se tiene el bioventeo y barreras permeables entre otras (Hatzikioseyan, 2010; Xu & Lu, 2010).

### **3.3.2. Biorremediación ex-situ**

En esta estrategia de biorremediación el suelo y/o el agua subterránea contaminada es removida de su lugar original para luego ser arado, agitado o mezclado antes de aplicar los tratamientos biológicos como ejemplo de esta estrategia se tiene el land farming y biopilas entre otras (Hatzikioseyan, 2010; Xu & Lu, 2010). Según Wu et al (2016) existen dos tecnologías de biorremediación: bioaugmentación y bioestimulación.

#### **Bioestimulación**

En la bioestimulación hay una modificación del ambiente por la adición de nutrientes para evadir las limitaciones metabólicas de las comunidades microbianas autóctonas (Wu et al., 2016). Nutrientes como nitrógeno, fósforo y aceptores de electrones son empleados para estimular la velocidad de degradación del contaminante (Hatzikioseyan, 2010). Los nutrientes empleados en la bioestimulación son frecuentemente solubles en agua como las sales minerales, urea, amonio anhidro y muchos fertilizantes inorgánicos; la ventaja del uso de nutrientes inorgánicos sobre fertilizantes orgánicos es la eliminación de competencia por la fuente de carbono (Hatzikioseyan, 2010). Los nutrientes pueden ser esparcidos mediante spray o extendidos en forma granular (Hatzikioseyan, 2010). En la bioestimulación se debe determinar el potencial de los microorganismos autóctonos para degradar el contaminante presente y valorar los factores limitantes para que sean controlados (Gómez Jovel, 2009).

### **Bioaumentación**

La bioaumentación consiste en aumentar la biomasa de la población bacteriana (Xu & Lu, 2010) mediante la inoculación de microorganismos alóctonos para mejorar la biodegradación de los contaminantes (Hatzikioseyian, 2010; Wu et al., 2016). La introducción de microorganismos no reemplaza la población microbiana autóctona (Hatzikioseyian, 2010). Según Suja et al (2014) se refiere la población microbiana autóctona debido a que están adaptados y aclimatados a las condiciones propias del lugar.

El éxito de la inoculación depende de factores como: 1) la población de microorganismos de ser capaz de sobrevivir y crecer en el nuevo ambiente, 2) los microorganismos deben retener su capacidad degradativa en el nuevo ambiente, 3) los microorganismos deben tener contacto con el contaminante, 4) nutrientes, donadores, aceptores de electrones deben estar disponibles para el crecimiento y que la población de microorganismos puede degradar el contaminante (Hatzikioseyian, 2010). Según Hatzikioseyian (2010) “desafortunadamente los microorganismos que son eficientes en condiciones de laboratorio no lidian bien en el mundo real”.

### **Atenuación natural**

La atenuación natural ocurre sin la intervención humana, sin la mejora en procesos físicos, químicos o biológicos. Esta depende de procesos naturales para degradar o disminuir los contaminantes presentes en suelo o agua subterránea. La presencia de nutrientes, aceptores de electrones, biodisponibilidad del contaminante y la presencia de microorganismos son factores que afectan los resultados obtenidos en la atenuación natural (Arrieta Ramírez, 2011; Hatzikioseyian, 2010).

La atenuación natural limita la migración del contaminante, reduce la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración del mismo en el suelo o agua subterránea pero es necesario un proceso de monitoreo constante (Hatzikioseyian, 2010).

## **3.4. Surfactante**

Los surfactantes se caracterizan por tener en su molécula grupos hidrofílicos o polares e hidrofóbicos o no polares (Atagana et al., 2003; Lee et al., 2005), los cuales se encuentran unidos por un enlace covalente (Galaz Montoya, 2007). El surfactante en el medio tiende a ubicarse en la interfase de los fluidos (Galaz Montoya, 2007; Morales Quintana, 2007; Orantes Gómez, 2002), reduciendo la tensión superficial del medio en el que se encuentren disueltos y disminuyendo la tensión interfacial si el sistema donde se encuentran es multifásico (Galaz Montoya, 2007), por lo cual incrementan la solubilidad y/o movilidad de compuestos hidrofóbicos en el agua (Orantes Gómez, 2002).

La clasificación de los surfactantes se da de acuerdo a la naturaleza del grupo hidrofílico en iónicos y no iónicos (Galaz Montoya, 2007; Morales Quintana, 2007), los cuales pueden ser anfóteros, catiónicos, aniónicos o zwitterionicos (Miller, Möbius, & Fainerman, 2001). En los surfactantes no iónicos el grupo hidrofílico no se disocia por lo tanto no posee carga eléctrica en una solución acuosa (Galaz Montoya, 2007; Miller et al., 2001), sin embargo poseen naturaleza polar (Orantes Gómez, 2002). La principal parte de los surfactantes no iónicos puede estar clasificada como alcoholes, ésteres, poli éteres y sus combinaciones. La importancia radica en la alta producción que poseen además de ser los más diversos con respecto a las propiedades y estructura (Miller et al., 2001). Los surfactantes aniónicos poseen el grupo hidrofílico cargado negativamente, tienen alta formación de espuma, capacidad de dispersión, sensibilidad a la dureza del agua y desnaturalización de proteínas (Miller et al., 2001) por estas características los detergentes aniónicos son ampliamente utilizados en sistemas detergentes además de ser no tóxicos (Orantes Gómez, 2002). Los surfactantes catiónicos poseen una carga positiva en el grupo hidrofílico (Galaz Montoya, 2007; Morales Quintana, 2007). De acuerdo con la estructura química esos pueden subdividirse en alquil aminas, alquil aminasetóxicas, alquil imidazolininas y cuaternarias; el principal uso de estos surfactantes es como germicida (Orantes Gómez, 2002).

En los surfactantes anfóteros el grupo hidrofílico puede cargarse positiva o negativamente de acuerdo a las características del medio, estos poseen carga positiva en ambientes ácidos y poseen carga negativa en ambientes básicos (Morales Quintana, 2007). Los surfactantes zwitterionicos tienen propiedades aniónicas o catiónicas independientes del pH del medio (Miller et al., 2001) estos surfactantes exhiben baja toxicidad, muestran alta estabilidad en las espumas y alta resistencia a la dureza del agua al igual que alta degradación por oxidación (Mahajan & Sharma, 2011). Los surfactantes zwitterionicos han sido empleados en estudios biológicos por su capacidad de solubilizar las membranas de las proteínas (Mahajan & Sharma, 2011). Estos surfactantes se usan combinados con aniónicos o catiónicos en muchos productos (Mahajan & Sharma, 2011). Generalmente los surfactantes iónicos son más tóxicos para los microorganismos que los no iónicos (Atagana et al., 2003).

Una propiedad importante de los surfactantes es la Concentración Micelar Crítica (CMC), a esta concentración las moléculas del surfactante se agrupan para formar estructuras llamadas micelas; antes de la CMC los surfactantes se encuentran como monómeros adsorbidos en la interfase (Galaz Montoya, 2007; Lee et al., 2005; Morales Quintana, 2007; Orantes Gómez, 2002). El tamaño de las micelas es pequeño, comprendida en unas pocas decenas de nanómetros (Hummel, 2000). Las micelas se componen por una parte interior no polar donde se distribuyen los compuestos orgánicos y una exterior polar que brinda alta solubilidad en el agua (Hummel, 2000; Orantes Gómez, 2002).

### 3.5. Leonardita

La leonardita está compuesta por lignitos altamente oxidados los cuales son una subclase de sustancias húmicas, estos lignitos contiene tres fracciones de sustancias húmicas entre las que se encuentran las huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, además poseer material mineral dependiendo de su pureza (Lipczynska-kochany & Kochany, 2008). Las sustancias húmicas son una fracción importante en la materia orgánica del suelo y la cual tiene influencia positiva sobre la fertilidad, el incremento de disponibilidad de nutrientes (Ratanaprommanee & Shutsrirung, 2013).

**Tabla 3-1**

*Ficha técnica de Leonardita*

Compuesto	Concentración (g/L)
Oxido de potasio	68,5
Carbono del extracto húmico total	50,0
Carbono de ácidos húmicos	45,0
Carbono de ácidos fúlvicos	5,0
Sólidos insolubles	22,6
Sodio soluble en agua	0,15

*Nota:* Tomado de (Trejos Delgado, 2017)

Bratkova, Nikolova, Chakalov, & Rilski (2012) encontraron que las sustancias húmicas liberan nutrientes para las plantas de manera lenta, aumentan el intercambio catiónico, genera un efecto tampón en el suelo, interactúa con iones tóxicos y con compuestos xenobióticos. Las condiciones del suelo mejoran a largo plazo ya que la leonardita incrementa la producción de enzimas (Turgay, Erdogan, & Karaca, 2010).

### 3.6. Melaza

La melaza es una fuente de carbono usada como co-sustrato en procesos de biorremediación ya que más del 60% de su composición está formada por sacarosa y diferentes azúcares además de contener, vitaminas, minerales y aminoácidos que en conjunto aumentan la actividad bacteriana (Prada Vásquez, 2016).



**Tabla 3-2***Composición de la melaza de caña de azúcar*

Componentes	Constituyentes	Contenido (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78
	Proteínas	3
	Azúcares reductores	3-5
	Sacarosa	60-63
	Sustancia disueltas (diferentes azúcares)	4-8
	Agua	16
	Grasas	0,40
	Cenizas	9
Contenido de minerales	Calcio	0,74
	Magnesio	0,35
	Fósforo	0,08
	Potasio	3,67
Contenido de aminoácidos	Glicina	0,10
	Leucina	0,01
	Lisina	0,01
	Treonina	0,06
	Valina	0,02
Contenido de vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48,86 ppm
	Ácido Pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Ribloflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

*Nota:* Tomado de (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007)

### 3.7. Compost

"La FAO define como compost a la mezcla de materia orgánica en descomposición en condiciones aeróbicas que se emplea para mejorar la estructura del suelo y proporcionar nutrientes" (Román, Martínez, & Pantoja, 2013). Para asegurar la calidad del compost se deben garantizar el cumplimiento de fases para su elaboración entre las que se encuentran la fase mesófila, la fase termófila, fase de enfriamiento y fase de maduración (Román et al., 2013). El compost por ser un agente de esponjamiento mejorara la aireación del suelo y el transporte de nutrientes. Según Terrón (1992) la materia orgánica del compost le da las siguientes propiedades químicas al suelo: Aumento del poder tampón, regulador de pH, aumento de capacidad de cambio catiónico, forma quelatos, mantiene reservas de nitrógeno. En la Tabla 3-3 se muestra la composición del compost maduro empleado en los tratamientos de biorremediación.

**Tabla 3-3***Composición del compost*

<b>Componente</b>	<b>Composición</b>
Arena	76%
Limo	16%
Arcilla	8%
Clase	Franco Arenoso
Materia orgánica	18,3 mg/kg
Fósforo	358 mg/kg
Nitratos	51 mg/kg
Amonio	34%

*Nota:* Tomado de (Trejos Delgado, 2017)

### **3.8. Factores que intervienen en la biorremediación**

#### **3.8.1. Textura**

De acuerdo con Gisbert Blanquer, Ibáñez Asensio, & Moreno Ramón (2010) la textural del suelo se define como "el porcentaje en peso de las partículas menores a 2 mm de diámetro, arena, arcilla y limo, existentes en los horizontes del suelo". Se debe tener en cuenta que la textural del suelo varía de un horizonte a otro, con lo que se convierte en una característica de los mismos. Cada una de las partículas posee características físicas y químicas diferentes lo que afecta en propiedades del suelo como la aireación, movimiento del agua, retención de humedad, liberación de iones, disponibilidad de nutrientes, contenido de materia orgánica y resistencia al cambio del pH (Jaramillo, 2002; Kogbara, Ayotamuno, Worlu, & Fubara-Manuel, 2015). Además se ha encontrado una correlación positiva entre el contenido de arcilla y la riqueza bacteriana al igual que índices de diversidad (Naveed et al., 2016).

#### **3.8.2. Humedad**

La humedad es la cantidad de agua que posee un suelo y está determinada por la textura, contenido de materia orgánica y del arreglo que presente el medio físico, por lo tanto se ha encontrado que el contenido de agua es linealmente proporcional al contenido de arcilla o materia orgánica presente en un suelo (Jaramillo, 2002).

Una cantidad adecuada de agua en la matriz del suelo permite el movimiento de nutrientes través del mismo y de los microorganismos que viven en él ya que estos requieren un medio acuoso para llevar a cabo el metabolismo (Prada Vásquez, 2016; Trejos Delgado, 2017). La humedad del suelo tiene alto impacto en la solubilidad y el pH además de relacionarse directamente con la aireación, una alta humedad promueve el desarrollo de zonas anaerobias (Eweis, Ergas, Chang, & Schroeder, 2002).

### **3.8.3. Potencial de Hidrógeno**

El pH es la propiedad del suelo que establece el grado de acidez o de alcalinidad y afecta propiedades físicas, químicas y biológicas (Jaramillo, 2002). Se ha encontrado que los microorganismos exhiben un crecimiento máximo en pH entre 6 y 8; condiciones ácidas o alcalinas inhiben la actividad microbiológica (Eweis et al., 2002) ya que se hidrolizan algunos componentes microbianos o se presenta desnaturalización de las enzimas (Atlas & Bartha, 2002).

### **3.8.4. Potencial redox**

"Numerosas reacciones enzimáticas son reacciones de oxidación-reducción en las que un compuesto es oxidado y el otro es reducido, la capacidad de un organismo para llevar a cabo esas reacciones depende del estado de oxidación-reducción del ambiente" (Atlas & Bartha, 2002).

El potencial redox está constituido por la porción de componentes oxidados en relación a los componentes reducidos. Ambientes que acepten electrones de un electrodo normal de hidrógeno a una media-cédula tiene un potencial redox positivo y cualquier ambiente que done electrones posee un potencial redox negativo. Los ambientes con potenciales redox positivos y altos favorecen ambientes de oxidación mientras que los ambientes con un potencial redox negativo y bajo indican ambientes fuertemente reducidos. Los microorganismos aerobios estrictos son metabólicamente activos en valores redox positivos mientras que los anaerobios estrictos son metabólicamente activos en valores negativos y los anaerobios facultativos son activos en un amplio rango de potencial redox (Atlas & Bartha, 2002).

### **3.8.5. Temperatura**

Los microorganismos poseen temperaturas óptimas de crecimiento en donde presentan tasas de reproducción y crecimiento elevadas, por tal motivo es un factor a tener en cuenta en los procesos de biorremediación (Atlas & Bartha, 2002). Se sabe que la bacterias presentes en el suelo son mesófilas (Trejos Delgado, 2017) y por ende el rango de temperatura en el cual crecen oscila entre 20 y 40 °C (Atlas & Bartha, 2002).

### **3.8.6. Disponibilidad de nutrientes**

El nitrógeno se encuentra presente en nutrientes inorgánicos como el amonio, nitrato y nitrito y es necesario para la síntesis de proteínas (Atlas & Bartha, 2002). Se sabe que algunos microorganismos utilizan nitrito como aceptor final de electrones en las vías metabólicas respiratorias, en ese caso se produce desnitrificación en la cual se libre nitrógeno gaseoso (Atlas & Bartha, 2002).

El fósforo es necesario para la formación de ácidos nucleicos, la generación de ATP, la síntesis de fosfolípidos y hace parte de la membrana celular aunque una concentración elevada puede inhibir el crecimiento microbiano (Atlas & Bartha, 2002; Prada Vásquez, 2016). Los suelos generalmente poseen un contenido de fósforo bajo debido a la baja solubilidad ya que este precipita en presencia de cationes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  en pH desde neutro hasta alcalino (Prada Vásquez, 2016). El fósforo se presenta en el suelo de forma orgánica en los ácidos húmicos y de forma inorgánica en combinación con Hierro, Aluminio y Calcio (Prada Vásquez, 2016).

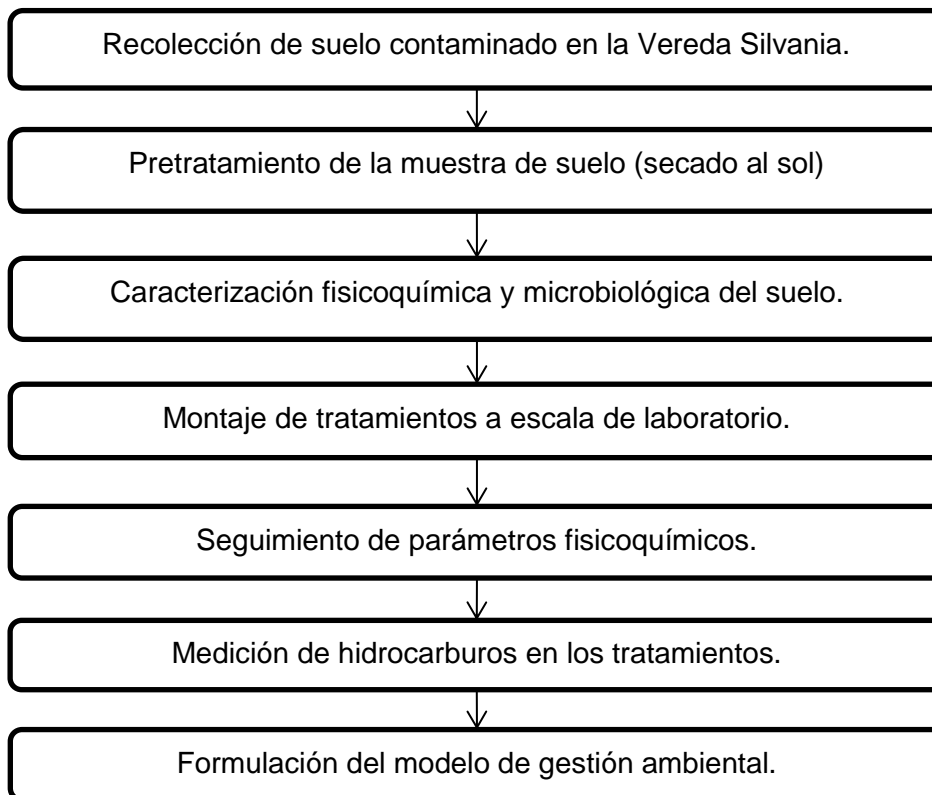
### **3.8.7. Aceptor y donador de electrones**

En la respiración microbiana se obtiene la energía necesaria para que los microorganismos desarrollen sus funciones vitales. "Mediante la respiración, los electrones son transferidos desde un donante a un aceptor a través de un transportador biológico de electrones, produciendo energía química, la cual es almacenada en moléculas de trifosfato de adenosina (ATP)" (Prada Vásquez, 2016). En los procesos de biorremediación el contaminante o cofactores pueden actuar como donador de electrones, mientras que el aceptor de electrones depende si el proceso es aerobio o anaerobio (Prada Vásquez, 2016). En los procesos anaerobios los aceptores de electrones pueden ser nitrato o sulfato (Trejos Delgado, 2017).

## 4. Metodología

En el presente capítulo se presenta la metodología que se llevó a cabo durante la investigación además de los pasos seguidos en la ejecución del proceso de biorremediación y los procesos evaluados. Se presentan también los equipos empleados y los análisis estadísticos. La propuesta de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del grupo de Investigación de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Las pruebas analíticas para cuantificar la concentración de hidrocarburos y su composición en las muestras se realizaron en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia.

**Figura 4-1** Metodología de trabajo



## 4.1. Materiales y métodos

### 4.1.1. Diseño de experimentos

Se emplea un diseño experimental ANOVA de un factor y siete niveles correspondientes a los tratamientos de control (C), atenuación natural (AT), bioestimulación (BE), bioestimulación con surfactante (BES), bioaumentación (B), bioaumentación con surfactante (BS) y bioestimulación con surfactante y D-limoneno (BESL). Cada uno de los tratamientos cuenta con tres réplicas. Se realiza una comparación entre la medias para determinar la diferencia significativa a partir de la prueba Scheffé.

**Tabla 4-1**

*Diseño de experimento*

Número experimento	Nivel de tratamiento						
	C	AT	B	BS	BE	BES	BESL
[HTP] <sub>i</sub>	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1	Xi1
[HTP] <sub>f</sub>	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3

*Nota:* Elaboración propia

Donde: X: factor medible (Concentración de TPH en suelo)

i: estado inicial

f: estado final

### 4.1.2. Equipos y Reactivos

Medidor multiparamétrico portátil modelo: HQ40d de pH, conductividad, potencial redox, Ro-tap, Cabina de flujo laminar horizontal Isocide modelo SPD-4AS2, plancha de calentamiento marca Velp Scientifica, balanza analítica APX-.203, horno de secado marca Memmert y autoclave modelo 25X-, SENose.

La urea ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) de grado comercial marca PQP se usa como fuente de nitrógeno en los tratamientos de bioestimulación, el fosfato de potasio dibásico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  marca Merck se usa como fuente de fósforo en los tratamientos de bioestimulación, Black diamond de marca NARPES se usa como fuente de potasio, ácidos húmicos y fúlvicos en los tratamientos de bioestimulación, nitrato de potasio  $\text{KNO}_3$  marca Chemí como aceptor de electrones, la melaza empleada en los tratamientos de bioestimulación se adquirió de Tierragro. Para el recuento en placa de bacterias heterótrofas se emplea Nutrient Agar Difco<sup>TM</sup> y para el recuento de bacterias hidrocarburoclastas se emplea Agar Bacteriológico N°1 marca Oxoid.

Para determinar el contenido de carbono orgánico se emplean dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) marca Carlo Erba, ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) J.T Baker y sacarosa J. T Baker.

Para la determinación del fósforo total se emplea ácido clorhídrico HCl marca Merck grado industrial, cloruro estannoso dihidratado marca Merck, Fluoruto de amonio marca Merck, molibdato de amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  Merck grado industrial.

#### 4.1.3. Recolección de muestra del suelo contaminado

El suelo usado para esta investigación se recolectó en la Vereda Silvania del departamento del Putumayo. La finca se encuentra en poder de una familia de la zona que ha sido afectada por los derrames de hidrocarburo procedentes del Oleoducto TransAndino. Se realizó un muestreo aleatorio y siguiendo los parámetros establecidos por el manual de Environmental Protection Agency (EPA, 1991).

#### 4.1.4. Pretratamiento de la muestra de suelo

El suelo fue sometido a secado mediante radiación solar y posteriormente triturado ya que contenía gran cantidad de agua y terrones en su estructura. El suelo seco y triturado fue llevado a un tamaño de partícula de dos milímetros para homogeneizar la muestra. Para garantizar el tamaño de partícula se usó una malla 20 U.S. STD. Sieve y el equipo Ro-tap.

#### 4.1.5. Caracterización de la muestra de suelo

La caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo se llevó a cabo en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. La caracterización se realizó a una muestra de suelo sin ningún tratamiento de biorremediación y a una muestra de suelo correspondiente al tratamiento de biorremediación con mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos. En la Tabla 4-2 se muestran las propiedades fisicoquímicas y la técnica empleada.

**Tabla 4-2**

*Propiedades fisicoquímicas*

<b>Prueba experimental</b>	<b>Técnica analítica</b>
Potencial de Hidrógeno	Método de dilución (Jackson, 1964)
Materia orgánica	Walkey Black (Walkey & Black, 1934)
Suma de cationes intercambiables	Acetato de amonio
Fósforo total	Bray II (Bray & Kurtz, 1945)
Nitrógeno total	Nitrógeno Kendall (Jackson, 1964)
Contenido de nitrato	Sulfato de Aluminio
Contenido de nitrógeno amoniacal	Método de Nessler (Nessler, 1999)
Densidad real	Método del picnómetro (Aguilera, 1989)
Textura	Bouyoucos
Humedad	Método del Horno (Jackson, 1964)

*Nota:* Modificado de Informe de Laboratorio No. 49441

### 4.1.6. Montaje a escala de laboratorio

Para el montaje a escala de laboratorio se emplearon bandejas con tapa para evitar la entrada de aire a los microcosmos. A cada bandeja se le adicionó dos kilogramos de suelo, se mantuvo una humedad del 59% y se empleó el nitrato de potasio como aceptor de electrones. En la Tabla 4-3 se listan los tratamientos de biorremediación evaluados.

**Tabla 4-3**

*Tratamientos de biorremediación evaluados a escala de laboratorio*

Tratamientos	Nombre	Especificaciones
Control	C	Suelo con crudo más ácido clorhídrico
Atenuación Natural	AT	Suelo con crudo
Bioaumentación	B	Suelo con crudo más compost
Bioaumentación con surfactante	BS	Suelo con crudo más compost y Tween 80
Bioestimulación	BE	Suelo con crudo más melaza y leonardita
Bioestimulación con surfactante	BES	Suelo con crudo más melaza, leonardita y Tween 80
Bioestimulación con surfactante y D-limoneno	BESL	Suelo con crudo más melaza, leonardita, D-limoneno y Tween 80

*Nota:* Elaboración propia

Mediante conteo en caja Petri se determinó que el contenido de bacterias en el compost es de  $1,8 \times \frac{10^8 \text{ UFC}}{\text{g}}$ , cantidad para aumentar el número de bacterias en los tratamientos de Bioaumentación, a estos tratamientos se adicionó el 10% para no diluir los HTP presentes en las muestras. La relación de Carbono, Nitrógeno, Fósforo para los tratamientos de Bioestimulación se realizó mediante el método de McCarty como se muestra en el siguiente numeral.

#### Tratamientos de biorremediación

**Control:** Para evitar el crecimiento de microorganismos se adicionó ácido clorhídrico al dos molar a los microcosmos.

**Atenuación natural:** No se agregó ningún nutriente o fuente de carbono a los microcosmos con suelo contaminado.

**Bioaumentación:** Se adicionó 10% de compost a los microcosmos para aumentar la densidad bacteriana.

**Bioaumentación con surfactante:** Se adicionó 10% de compost y Tween 80 a los microcosmos para aumentar la densidad bacteriana y solubilizar el hidrocarburo adherido a la matriz del suelo respectivamente.



**Bioestimulación:** Se mantuvo una relación C:N:P de 100:12:2 en los tratamientos de bioestimulación (BE, BES y BESL), se usó urea como fuente de nitrógeno y poli fosfato de sodio como fuente de fósforo. En los tratamientos con Tween 80 (BES y BESL) se añadió la concentración micelar a cada microcosmos. El D-limoneno se adicionó de manera equivalente al surfactante. La leonardita se adicionó al 3% (Turgay et al., 2010).

#### 4.1.7. Cálculo dosificación de nutrientes

Con el balance de masas se puede determinar la cantidad de nutrientes y aceptor de electrones que necesitan los microorganismos y se obtiene una estimación de la cantidad de productos finales en el diseño de sistemas de tratamiento biológico. El balance de las ecuaciones químicas se basa en el concepto de estequiometría sin embargo algunas características de las reacciones microbianas como la oxidación y reducción de más de una especie, los roles de catálisis para la reacción y los productos de la reacción además de las reacciones químicas para la síntesis de células complican la estequiometría (Rittmann & McCarty, 2001)

Para obtener una reacción global es necesario conocer la reacción de energía y reacción de síntesis de los microorganismos. Para conocer las reacciones anteriores se plantean aproximaciones de reacciones medias (Rittmann & McCarty, 2001) con las siguientes ecuaciones.

$$R_e = R_a - R_d \quad \text{Ecuación 4-1}$$

$$R_s = R_c - R_d \quad \text{Ecuación 4-2}$$

Donde  $R_e$  es la reacción de energía,  $R_a$  es la semi-reacción del aceptor de electrones,  $R_d$  es la semi-reacción del donador de electrones,  $R_s$  es la reacción de síntesis y  $R_c$  es la semi-reacción de síntesis.

#### 4.1.8. Cuantificación y cualificación de hidrocarburos totales del petróleo

El contenido de hidrocarburos totales se determinó mediante una metodología adaptada del Estándar Métodos 5520F, junto con un perfil cromatográfico obtenido por CG-MS (Cromatografía de gases acoplado a masas). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. En la cuantificación de los HTP se usaron viales de polipropileno de 50mL para centrifuga en donde se depositó 1.0 g de suelo seco y se adicionó 2.5g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro (Panreac®). A continuación se agregó a cada vial 5ml de diclorometano marca Chemi, grado analítico y se llevó al vortex durante 90 segundos. Las muestras fueron centrifugadas en un equipo Jouan serie MR22 a 7000 rpm durante 20 minutos. El proceso de lavado del

suelo se repitió dos veces más sobre el residuo sólido remanente hasta lograr un volumen aproximado de 15 mL de sobrenadante. Se empleó un rotaevaporador Heidolph (Laborota 4003-control) operando a una temperatura de 40°C y una presión de 740 mmHg para separar el extracto orgánico del solvente. Este último se resuspendió en 1.0 mL de diclorometano en viales de 1.5 mL marca Agilent ámbar provistos de tapas roscadas con tapón de teflón (Trejos Delgado, 2017).

En la cualificación de los HTP se utilizó un cromatógrafo marca Agilent serie 6890N con un detector selectivo de masas Agilent 5973 Network y un inyector Agilent 7683. Se empleó una columna DB-TPH -123-1632 marca Agilent Technologies de 30m de longitud, 0.32mm de diámetro y una película del empaque de 0.25µm. Todas las muestras fueron corridas bajo las siguientes condiciones: una temperatura inicial fue de 60°C durante 2 minutos, posteriormente la temperatura aumentó 8°C por minuto hasta alcanzar los 300°C, manteniéndose allí por 8 minutos más. La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C; mientras que la temperatura del detector fue de 340°C; el gas de arrastre usado fue hidrógeno trabajando a un flujo constante de 2.0 mL por minuto. La concentración de contaminante en las muestras fue identificada y cuantificada con un estándar que contenía una mezcla de hidrocarburos alifáticos de C8-C40 (S-4149-500-MX, Chiron AS) con un total de 35 analitos resuspendidos en disulfuro de carbono-diclorometano (3:1) (Trejos Delgado, 2017)

#### **4.1.9. Recuento en placa**

Se realizó un conteo en placa propuesto por Sil Society of America, Inc. Y American Society of Agronomy, Inc de Estados Unidos para todos los tratamientos de biorremediación a escala de laboratorio en donde se estudió el crecimiento de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas. Para el cultivo en placa de las bacterias heterótrofas se usó Agar nutritivo Difco™ cuya fórmula aproximada es extracto de carne 3.0 g/L, peptona 5.0 g/L y Agar 15 g/L. Para el cultivo en placa de las bacterias hidrocarburoclastas se usó Agar bacteriológico N1 marca OXOID. El método permite el recuento de una porción de los microorganismos debido a que todos no pueden replicarse mediante medios de cultivo tradicionales (Arrieta Ramírez, 2011; Gómez Jovel, 2009).

Se preparó una dilución de 1 gramo de suelo en 9 mililitros de agua destilada previamente esterilizada, esta corresponde a la dilución de  $10^{-1}$ , a continuación se agitó la mezcla durante 1 minuto y se tomaron 10 microlitros que se transfirieron a un nuevo tubo de ensayo con 9,9 mililitros de agua destilada, corresponde a la dilución  $10^{-3}$ , finalmente se toman 1 mililitro de la última dilución y se transfiere a un tubo de ensayo con 9 mililitros de agua destilada dando origen a la dilución  $10^{-4}$ . Para las bacterias heterótrofas se sembró una dilución de  $10^{-3}$  y para las bacterias hidrocarburoclastas una dilución de  $10^{-4}$ , se empleó crudo diluido con hexano como fuente de carbono para las bacterias hidrocarburoclastas. Se adicionó 100 µl crudo después de inocular las cajas

Petri. Todas las siembras se realizaron en profundidad. Las unidades formadoras de colonias se calculan mediante la Ecuación 4-3 (Fernández Linares et al., 2000).

$$\frac{UFC}{g\ s.s} = \frac{NC}{FD} \frac{V}{P * FH} \quad \text{Ecuación 4-3}$$

Donde:

UFC/ g s. s. = Unidades formadoras de colonias / g de suelo seco.

NC= número de colonias en una caja.

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inocula la caja ( $10^{-2}$  a  $10^{-10}$ ).

V= volumen inoculado en la caja = 0.1 ml.

P = peso de la muestra húmeda = 1 g.

FH = factor de corrección de humedad ( $1-(\%humedad/100)$ ).

#### 4.1.10. Potencial de Hidrógeno

El potencial de hidrógeno se determinó mediante dilución conservando una relación 1:10. Para esto se pesó dos gramos de suelo de cada uno de los microcosmos y se los llevó a 20 mililitros de agua destilada posteriormente se agitó en un vórtex durante 1 minuto, a continuación se midió el pH con un electrodo del equipo Hach Modelo HQ40d.

#### 4.1.11. Potencial Redox

Para la determinación del potencial redox se empleó un electrodo MTC10101 de la marca Hach, este se introdujo directamente en los microcosmos como se recomienda en (Kolmans & Vásquez, 1999).

#### 4.1.12. Humedad

La humedad del suelo se calculó mediante la Ecuación 4-4, para ello se pesó un crisol vacío  $M_r$ , el crisol con la muestra de suelo  $M_h$  y la muestra se llevó al horno durante 24 horas a 105 °C, finalmente se pesó el crisol con la muestra de suelo después del proceso de secado  $M_s$ .

$$\%Humedad = \frac{M_h - M_s}{M_s - M_r} 100 \quad \text{Ecuación 4-4}$$

#### 4.1.13. Patrón de emisión de gases

El patrón de emisión de gases se empleó como un indicativo de la actividad microbiana en los tratamientos exceptuando el tratamiento control, para esto se empleó el dispositivo SENose el cual consta de un microcontrolador y seis sensores, MQ-3, MQ-4, MQ-7, MQ-135, MQ-136, MQ-137, usados en la detección de alcohol, metano, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, sulfuro de hidrógeno y amoníaco respectivamente. Los

sensores están ubicados en un recipiente hermético conectados a un cable de alimentación y un cable de datos. Los datos son enviados cada tres segundos al software "Microplotter" (Pineda & Pérez, 2017). Microplotter recibe los datos leídos por los sensores y procede a graficar y guardar un archivo de texto (Pineda & Pérez, 2017). El software Microplotter guarda los datos en un archivo de texto donde los datos pueden ser copiados y pegados en el programa Microsoft Excel. Los datos obtenidos con el dispositivo SENose fueron agrupados por gases y graficados de acuerdo al tratamiento. Las gráficas presentadas corresponden a una de las tres réplicas realizadas.

Los sensores detectan concentraciones relativas de gas en términos del voltaje generado, los valores del voltaje son leídos a continuación por el microcontrolador, las lecturas se presentan en el Microplotter en una escala adimensional (ADC) entre 0 y 1023 (Pineda & Pérez, 2017). El voltaje detectado por los sensores es proporcional a la concentración del gas presente en el ambiente, la sensibilidad de los sensores empleados se muestra en la Tabla 4-4. Los datos son leídos por el microcontrolador cada tres segundos.

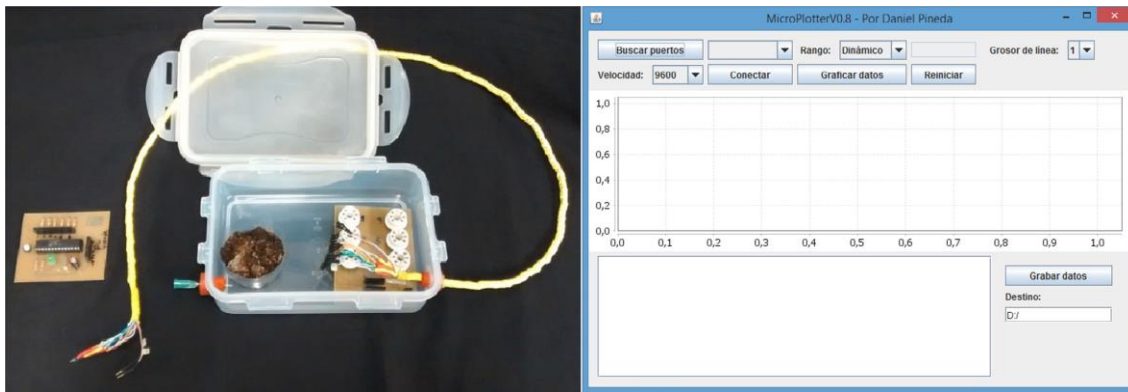
**Tabla 4-4**

Sensibilidad de los sensores empleados en el dispositivo SENose

Sensor	Sensibilidad
MQ-3	Alcohol
MQ-4	Metano
MQ-7	Monóxido de Carbono
MQ-135	Amoniaco, Óxidos de nitrógeno, Alcohol, Benceno
MQ-136	Sulfuro de hidrógeno
MQ-137	Amoniaco

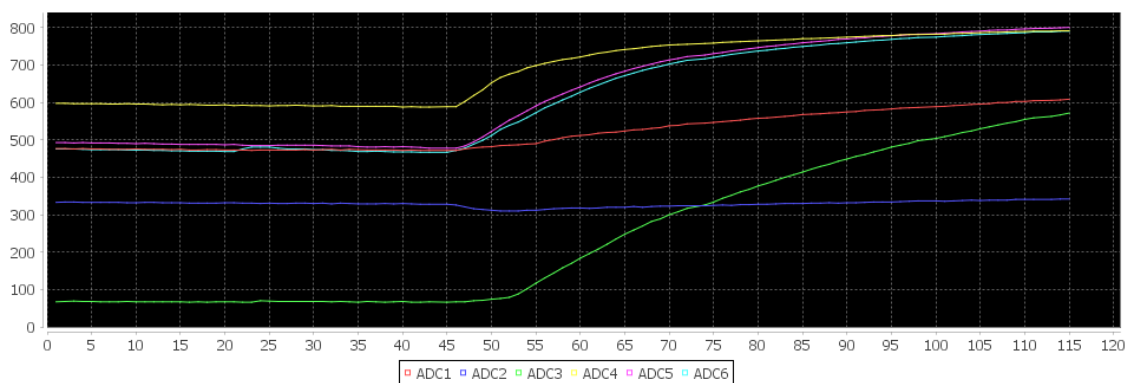
*Nota:* Elaboración propia

La *Figura 4-2* muestra la como está conformado el dispositivo SENose y la interface del software microplotter.

**Figura 4-2** Imagen SENose e interface

(Pineda & Pérez, 2017)

Debido a que los microcosmos superan el tamaño de SENose se empleó un dispositivo de volumen definido para contener los gases presentes. La lectura con SENose se realiza en dos fases consecutivas; en la primera SENose se introduce en el dispositivo de volumen definido junto con el microcosmos y este toma datos durante dos minutos aproximadamente, en la segunda fase se retira la tapa del microcosmos, se realiza una estimulación mecánica del suelo (levantar una porción de suelo con espátula) y de SENose con el fin de liberar los gases en las muestras y exponer los sensores a los gases liberados respectivamente. Una vez los gases y los sensores están en contacto se toma datos durante tres minutos aproximadamente. Las dos fases se hacen con el objetivo de visualizar el cambio entre los gases presentes en el ambiente y los procedentes de los microcosmos como se muestra en la Figura 4-3.

**Figura 4-3** Patrón de respiración en suelo contaminado



## 5. Análisis de resultados

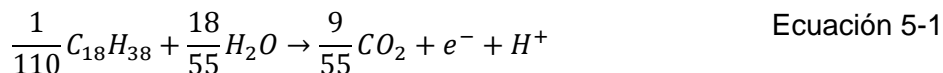
En este capítulo se presentan los resultados de los diferentes análisis realizados en esta investigación como caracterización fisicoquímica del suelo, potencial redox, pH, conductividad, crecimiento de bacterias heterótrofas, hidrocarburoclastas, porcentaje de remoción de hidrocarburos y patrón de emisión de gases en los microcosmos.

### 5.1. Cálculo dosificación de nutrientes

Para obtener la semi-reacción del donador de electrones se siguen los siguientes pasos:

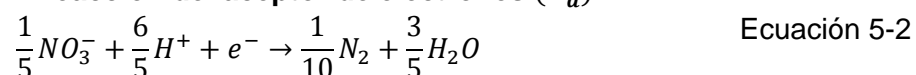
1. Escribir la forma oxidada del elemento de interés.
2. Agregar especies que son formadas o consumidas en la reacción.
3. Balancear la reacción para el elemento que es reducido y para todos los elementos excepto el oxígeno.
4. Balancear el oxígeno con adición o sustracción de agua.
5. Balancear el hidrógeno con la introducción de  $H^+$
6. Balancear las cargas en la reacción adicionando suficientes  $e^-$ .
7. Dividir la ecuación por el coeficiente de  $e^-$ .

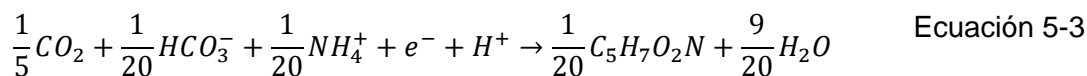
#### Semi-reacción del donador de electrones ( $R_d$ )



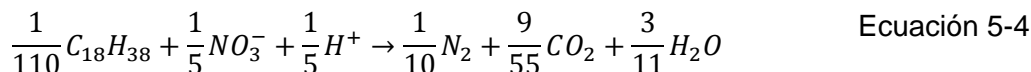
El crecimiento de las bacterias involucra dos reacciones básicas, una para la producción de energía y la otra para la síntesis celular. La semi reacción de síntesis celular se obtiene de la *tabla 2.4 del libro de McCarty and Rittmann* donde se toma el amonio como fuente de nitrógeno. La semi reacción del aceptor de electrones  $R_a$  se toma de la misma tabla, donde el aceptor de electrones escogido es el nitrato.

#### Semi-reacción del aceptor de electrones ( $R_a$ )

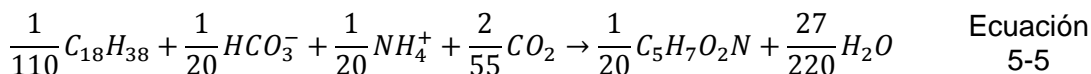


**Semi-reacción de síntesis ( $R_c$ )****Reacción de energía  $R_e = R_a - R_d$** 

Calculando se obtiene

**Reacción de síntesis  $R_s = R_c - R_d$** 

Calculando se obtiene



Para obtener la reacción global del proceso se emplea la siguiente ecuación

$$R = f_s R_s + f_e R_e$$

$$f_s + f_e = 1$$

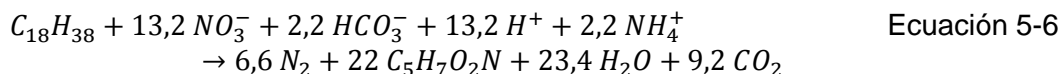
Dónde:

$f_s$  es la fracción asociadas con la generación de biomasa

$f_e$  es la fracción de la oxidación para energía

Ycuyos valores son 0,4 y 0,6 para  $f_s$  y  $f_e$  respectivamente

Aplicando el método de Mc Carty se obtiene la siguiente reacción global



Para obtener las relaciones moleculares de las especies que intervienen en la reacción ( $C:N:NO_3^-:P$ ) se procede de la siguiente forma:

Pesos moleculares de las especies que intervienen en la reacción:

$$C_{18}H_{38} = 252 \frac{g}{mol} \quad NO_3^- = 60 \frac{g}{mol} \quad N = 14 \frac{g}{mol}$$

$$1: \left(2,2 \times \frac{14}{252}\right) : \left(13,2 \times \frac{60}{252}\right) : \frac{1}{6} \left(2,2 \times \frac{14}{252}\right)$$



Luego la relación ( $C:NO_3^-:N:P$ ) es:

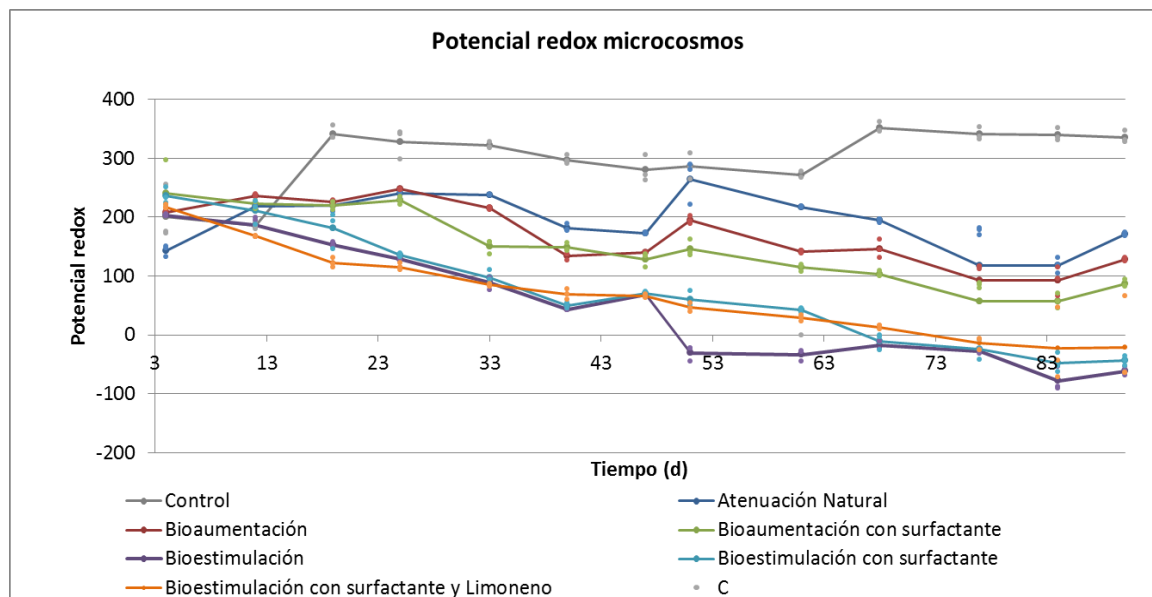
$$1:3,14:0,12:0,02$$

Ahora se tiene que para 100 gramos de petróleo crudo se necesitan 314 gramos de  $NO_3^-$  como aceptor de electrones, 12 gramos de Nitrógeno y 2 gramos de fósforo, obteniéndose así una relación aproximada de C:N:P de 100:12:2.

## 5.2. Parámetros fisicoquímicos

### 5.2.1. Potencial redox

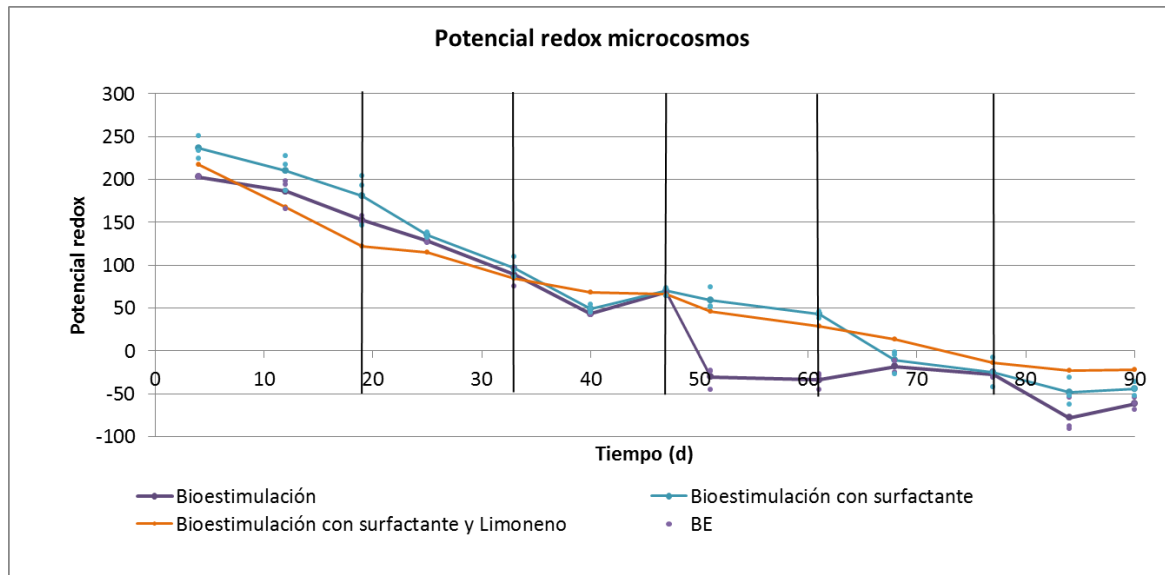
Puede observarse en Figura 5-1 que en todos los tratamientos exceptuando el control, los valores de potencial redox fueron disminuyendo a lo largo del tiempo, esto se debe al consumo de oxígeno disuelto por parte de bacterias anaerobias facultativas y aparición de compuestos como el amoníaco, sulfuro de hidrógeno y metano (Atlas & Bartha, 2002). Este comportamiento es reportado por Dell'Anno et al (2009) y lo atribuye al activo flujo de electrones entre el medio y las bacterias. En los tres tratamientos de bioestimulación (BE, BES, BESL) el potencial redox alcanzó valores negativos de -77,6 mV, -48,6 mV y -22,7 mV respectivamente lo que significa que a partir de ese momento se generan condiciones anaerobias en los microcosmos (W.-Y. Chen, Wu, Lin, & Chang, 2016). En los tratamientos de bioestimulación se adicionó leonardita y melaza, estos poseen en sus moléculas gran cantidad de carbono como se puede apreciar en las Tabla 3-1 y Tabla 3-2 respectivamente lo que favorece la aparición de condiciones anaerobias ya que se ha demostrado que los sistemas con alta cantidad de materia orgánica pueden llegar a poseer potenciales redox del orden de -400 mV (Atlas & Bartha, 2002; Bia, Davies, Albuquerque, & Randerson, 2012). Los tratamientos de bioaumentación (B y BS) al no poseer una fuente de carbono con mayor biodisponibilidad como la melaza, la respiración bacteriana se ve disminuida, lo que provoca un consumo de oxígeno disuelto más lento, por tal motivo el potencial redox se mantiene en valores positivos de 127,6 mV para bioaumentación y 86,8 mV para el tratamiento de bioaumentación con surfactante, el valor más bajo en el segundo tratamiento puede explicarse por la adición de Tween 80 que separa el hidrocarburo de la matriz del suelo convirtiéndolo en una fuente de carbono con mayor biodisponibilidad generando mayor consumo de oxígeno disuelto. Además los tratamientos de bioaumentación contienen 10% de compost el cual es un agente de esponjamiento que mejora la transferencia de oxígeno en los microcosmos. El potencial redox en el tratamiento control aumento debido a la adición de ácido clorhídrico que al mezclarse con el agua genera un ambiente oxidativo, lo cual aumenta los valores de potencial redox.

**Figura 5-1** Potencial redox a lo largo del tratamiento

Elaboración propia

Para establecer el mejor tratamiento de bioestimulación se dividió *Figura 5-1* en 6 tramos. Para los tramos obtenidos se calculó la pendiente. Se hizo un estudio estadístico usando análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de las pendientes. En el análisis de varianza indica que no existe diferencia significativa entre las medias del tramo 1 ( $p > 0,0001$ ), este mismo resultado es arrojado por el tramo 6, mientras que para los tramos del 2 al 5 el análisis de varianza indica que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras se realizó la prueba de múltiples rangos usando Scheffé, dado que este protege mejor del error tipo I.

La prueba de múltiples rangos para el tramo 2 y 3 indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos BES-BESL y entre los tratamientos BE-BESL este resultado sugiere que los efectos del D-limoneno en el tratamiento de Bioestimulación con surfactante y D-limoneno ejerce un efecto significativo en la disminución del potencial redox. En los tramos 4 y 5 la prueba de múltiples rangos indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos BE-BES y BE-BESL lo que sugieren que el D-limoneno y el Tween 80 ejercen un efecto en la disminución del potencial redox en estos periodos de tiempo. Las tablas con los resultados de las pruebas estadísticas se encuentran en el Anexo B

**Figura 5-2** Potencial redox en los tratamientos de bioestimulación

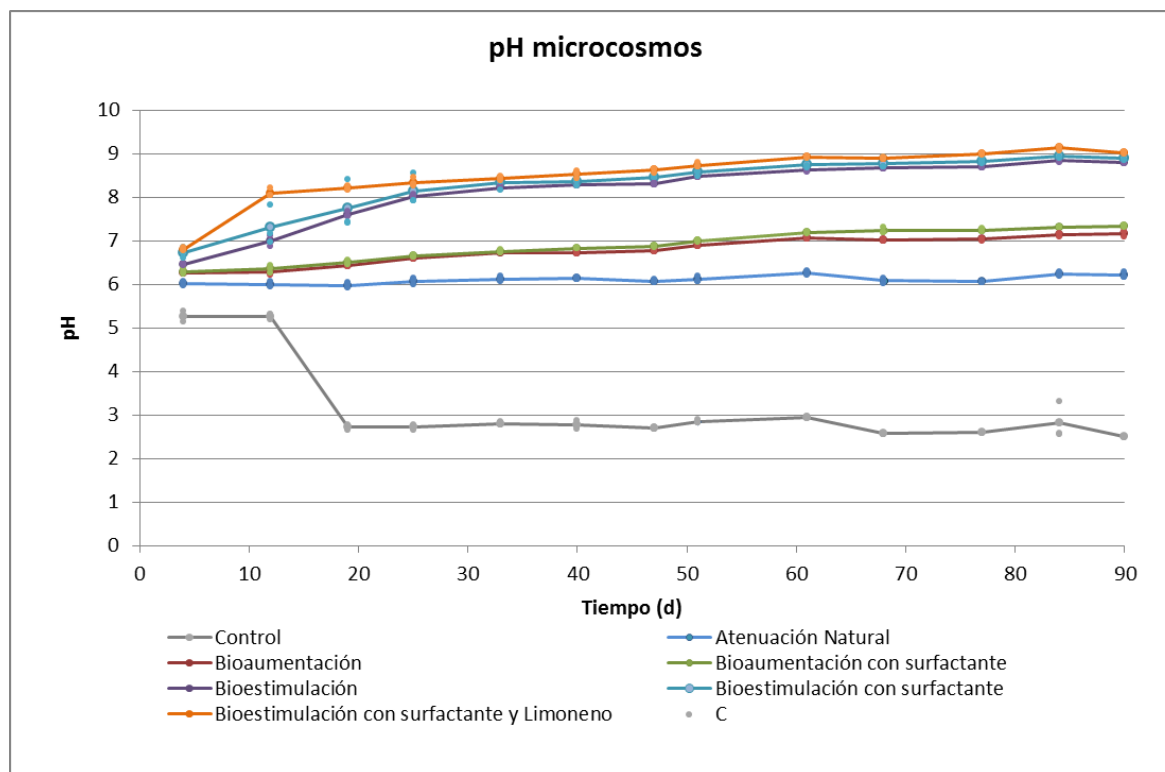
Elaboración propia

### 5.2.2. Potencial de Hidrógeno

En Figura 5-3 puede notarse una disminución del pH en el tratamiento del control en el día 19, esto se debió a la adición de ácido clorhídrico ya que se evidenció crecimiento de bacterias en el conteo realizado en cajas Petri. En el tratamiento de atenuación natural puede observarse un comportamiento estable en el pH debido a que solo se agregó agua destilada a lo largo del tratamiento. Los tratamientos de bioaumentación (B y BS) presentaron valores finales de pH de 7,2 y 7,3 respectivamente, el aumento de este parámetro se debe en parte a la formación de amoníaco como puede verse en el Anexo C donde se muestran las gráficas obtenidas con el dispositivo SENose, sin embargo el aumento en los valores de pH para estos tratamientos se da de forma gradual, este comportamiento puede explicarse por la propiedad química de regular el pH y aumentar el poder tampón que tiene el compost, este comportamiento se menciona en *Tratado de fitotecnica general*. En la Figura 5-4 se puede observar un rápido aumento del pH en los tratamientos de bioestimulación en el día 12, este aumento se debe a la hidrólisis de la urea. Se debe recordar que la urea fue agregada a estos tratamientos como fuente de nitrógeno. Sin embargo el amoníaco producido a partir de la urea se volatiliza de forma rápida en suelos no inundados como lo muestran Barbieri & Echeverría (2003) no obstante según (CIAT, 1981) los cationes  $\text{NH}_4^+$  son estables en condiciones reducidas del suelo y tienden a acumularse en suelos inundados. No obstante el aumento en el pH de estos tratamientos continúa alcanzando valores de 8,8 y 9,0 al final del tratamiento de biorremediación. El aumento sucesivo puede explicarse por la adición de Leonardita, la cual posee un pH de 8,46 según el fabricante. Otro factor que puede aumentar el pH es

el aumento en la respiración anaerobia como lo reporta Dell'Anno et al (2009) en su investigación en sedimentos marinos.

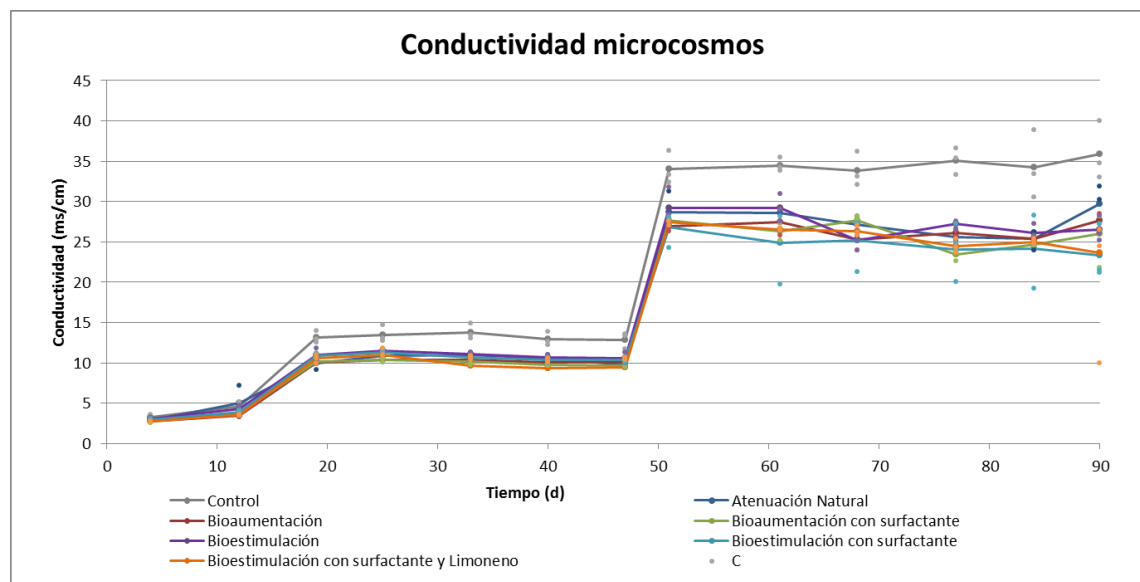
**Figura 5-3** Potencial de hidrógeno a lo largo del tratamiento



Elaboración propia

### 5.2.3. Conductividad eléctrica

En la Figura 5-4 se aprecia que todos los tratamientos poseen la misma tendencia debido a que se agregó igual cantidad de nitrato de potasio a los microcosmos y no se añadió ninguna otra sal. En el tratamiento de control por la adición de ácido clorhídrico al 2M y el contenido de nitrato de potasio se genera una reacción entre ellos produciendo así ácido nítrico y la sal cloruro de potasio, por tal motivo se puede observar un aumento en la conductividad. La conductividad crece en los días 19 y 47 ya que en estos días se agregó agua al sistema para conservar la humedad lo que disolvió la sal presente. En el cuarto día se presenta una conductividad muy baja debido a la gran cantidad de crudo en presente en el suelo, el crudo por ser una sustancia orgánica es mala conductora de la corriente eléctrica. Se puede observar que la adición de melaza, leonardita, Tween y D.-Limoneno no generan grandes cambios en los valores de conductividad ya que estas sustancias no se disocian en soluciones acuosas y por lo tanto son pobres conductores.

**Figura 5-4** Conductividad a lo largo del tratamiento

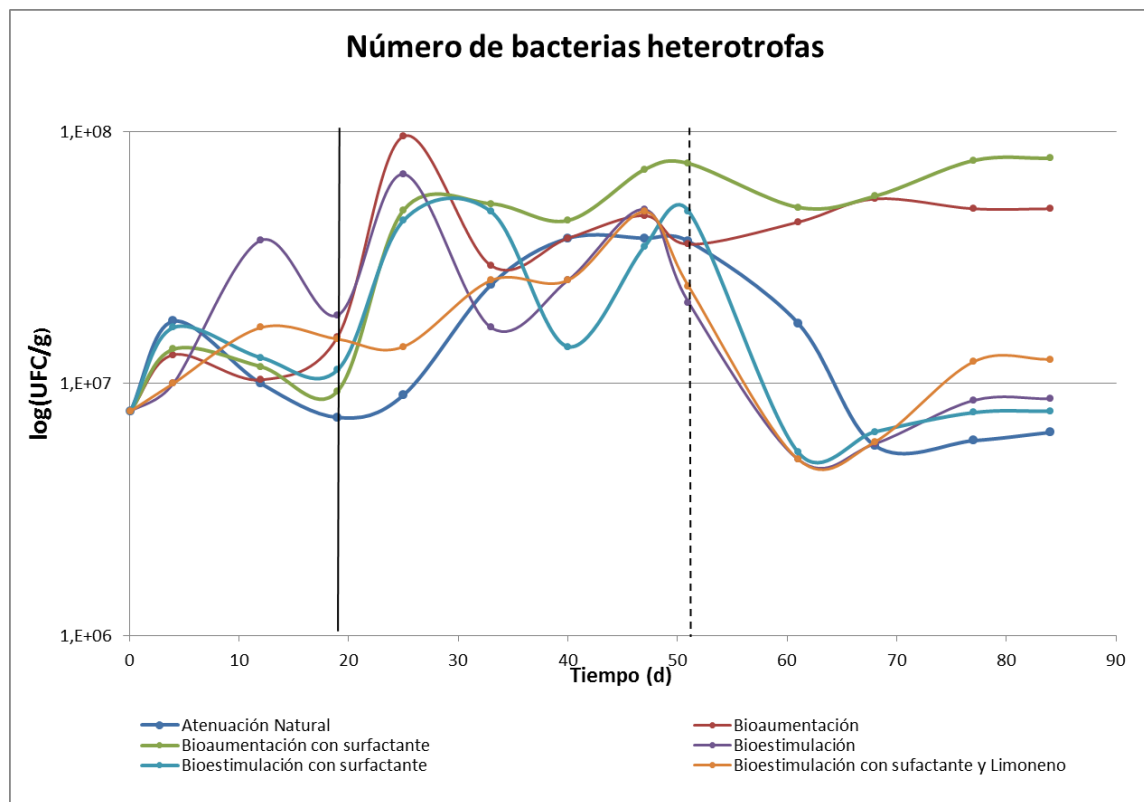
Elaboración propia

### 5.3. Número de bacterias heterótrofas e hidrocarburoclastas

El crecimiento de las bacterias heterótrofas a lo largo de los tratamientos de biorremediación se presentan en la Figura 5-5. Se puede observar que a partir del día 51 (línea punteada), el crecimiento bacteriano en los tratamientos de bioestimulación presentan una disminución en las unidades formadoras de colonia, este comportamiento se debe al aumento de los valores de pH como se muestra en la Figura 5-3 ya que al aumentar el pH se presenta inhibición de las bacterias (Totora, Funke, & Case, 2007). Estos tratamientos presentan un crecimiento bacteriano oscilatorio el cual coincide con la adición de nutrientes que se realizó cada 15 días; el aumento en el crecimiento de bacterias después de agregar nutrientes es reportado por (Trejos Delgado, 2017). En los tratamientos de bioaumentación se observan 3 de las 4 fases del crecimiento bacteriano (Totora et al., 2007), la primera fase correspondiente a la fase de adaptación desde el día 0 hasta el día 19 (línea continua), una segunda fase correspondiente a la fase exponencial que se dio en el día 25 y una tercera fase correspondiente a la fase estacionaria donde se presentaron crecimientos leves a partir del día 33, puede notarse que en el día 51 (línea punteada) la cantidad de bacterias no disminuyó como en los tratamientos de bioestimulación, esto se debe a que el pH en estos tratamientos se mantiene entre 6,9 y 7,3, valores que se encuentran en el rango de la neutralidad donde el crecimiento de la mayoría de las bacterias se ve favorecido (Totora et al., 2007). En el tiempo de la investigación los tratamientos de bioaumentación no llegan hasta la cuarta fase de crecimiento celular que corresponde a la fase de muerte celular mientras que en el tratamiento de atenuación se pueden observar las cuatro fases, la fase de adaptación

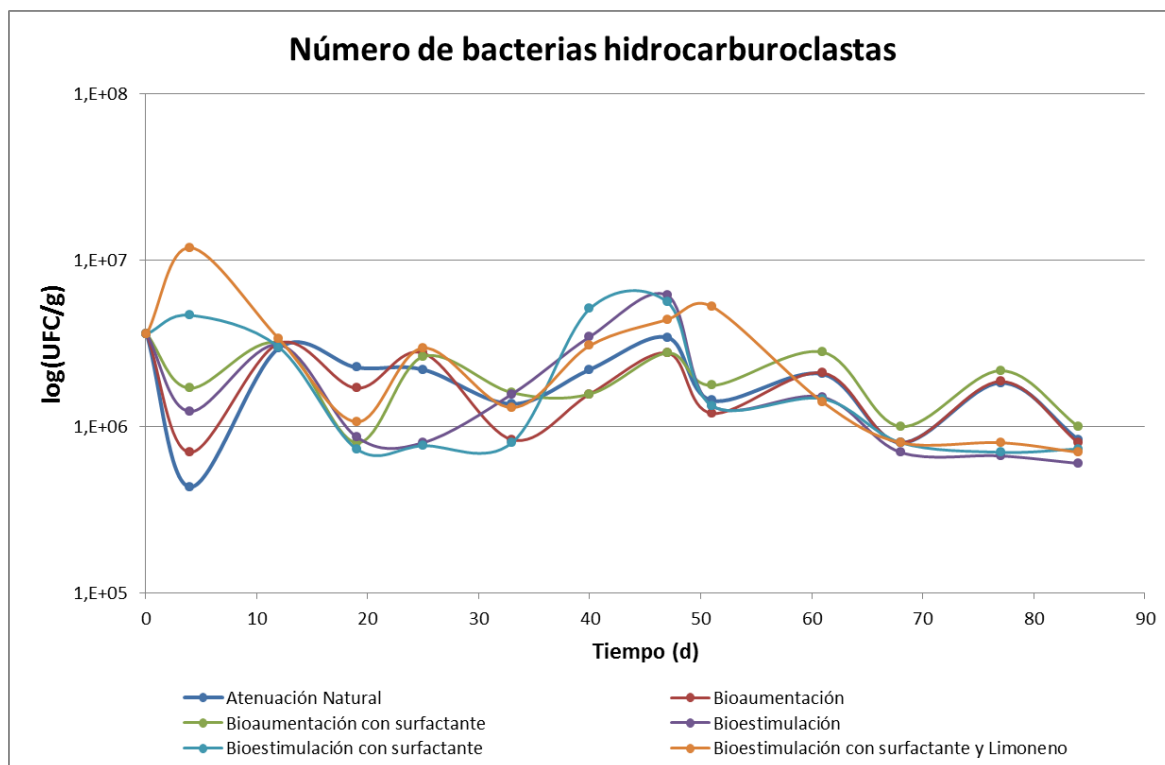
desde el día 0 hasta el día 25, la fase de crecimiento exponencial del día 25 hasta el día 33, la fase estacionaria que va del día 33 hasta el día 51 y a partir de este momento se presenta la fase de muerte celular.

**Figura 5-5** Número de bacterias heterótrofas a lo largo del tratamiento



Elaboración propia

El crecimiento de bacterias hidrocarburoclastas se observa en la Figura 5-6. Los tratamientos de bioaumentación (B y BS) presentan un crecimiento con leves aumentos en todo el tratamiento de biorremediación. En los tratamientos de bioestimulación (BE, BES) presentan una disminución en las unidades formadoras de colonia hasta el día 19 y un aumento de las mismas hasta el día 47 seguido de una disminución a partir del día 51; este comportamiento puede ser provocado por la disminución del pH como puede verse en la Figura 5-3. En el tratamiento BESL se observa un comportamiento similar a los dos anteriores, sin embargo en este el aumento en las unidades formadoras de colonias se da hasta el día 51 seguido de una disminución provocada por un cambio en el pH.

**Figura 5-6** Número de bacterias hidrocarburoclastas a lo largo del tratamiento

## 5.4. Concentración de HTP remanentes

En la Tabla 5-1 se pueden observar las concentraciones de HTP que persisten después de 90 días de los tratamientos de biorremediación en condiciones anaeróbicas.

**Tabla 5-1**

*Concentración de HTP remanente en los tratamientos de biorremediación*

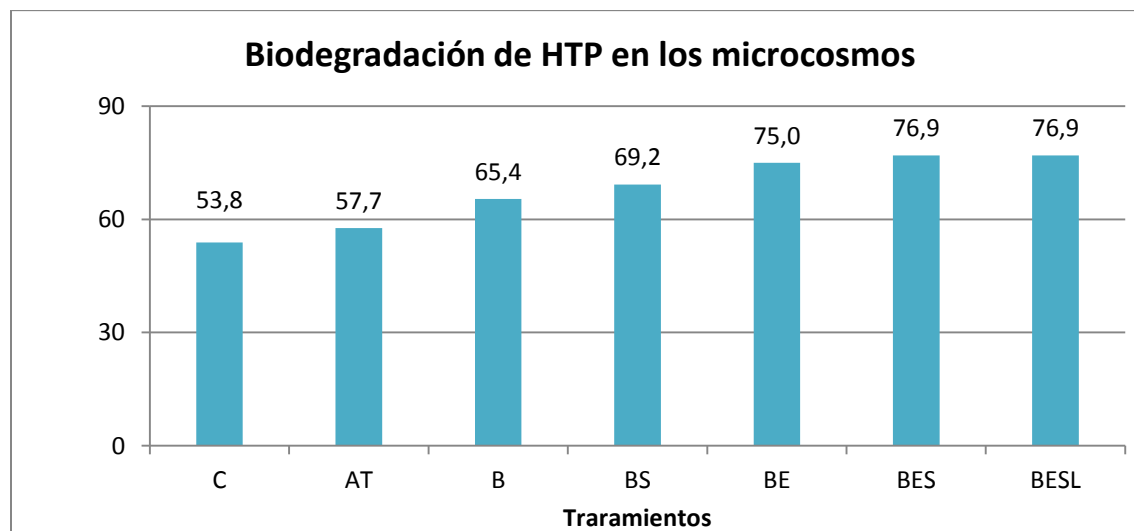
Tratamiento	Replica	Concentración remanente HTP (ppm)
Control	3	12000
Atenuación Natural	3	11000
Bioaumentación	3	9000
Bioaumentación con surfactante	3	8000
Bioestimulación	3	6500
Bioestimulación con surfactante	3	6000
Bioestimulación con surfactante y D-limoneno	3	6000

La Ecuación 5-7 fue usada para el cálculo del porcentaje de degradación que se obtuvo en cada uno de los tratamientos. El porcentaje de degradación se realizó teniendo en cuenta los HTP presentes inicialmente en las muestras de suelo.

$$\%degradación = 100 - \left( \frac{HTP_i - HTP_f}{HTP_i} \times 100 \right) \quad \text{Ecuación 5-7}$$

Los porcentajes de degradación que se obtuvieron en cada uno de los tratamientos de biorremediación después de 90 días se muestran en la Figura 5-7. Se puede observar que el tratamiento control tuvo un 53,8% de degradación de HTP. Este porcentaje de degradación se da por una reacción química entre el HCl y los hidrocarburos. El HCl se agregó a una concentración 2M para inhibir el crecimiento microbiano. El tratamiento de atenuación natural tuvo un porcentaje de degradación de 57,7% que corresponde al porcentaje más bajo exceptuando el control. Los tratamientos de bioestimulación (BE, BES y BESL) fueron los que obtuvieron porcentajes de degradación mayores, los cuales se encuentra entre 75 y 76,9 % mientras que los tratamientos de bioaumentación (B y BS) tienen porcentajes de degradación de 65,4 y 69,2 % respectivamente. La diferencia entre los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación está entre un 7,7 y 9,6, debido a la cercanía de los porcentajes de degradación, es necesario determinar si hay diferencia significativa entre ellos y de esta manera determinar cuál es el mejor tratamiento.

**Figura 5-7** Porcentaje de degradación en los microcosmos



Elaboración propia

De la Tabla 5-2 observar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de bioestimulación con surfactante (BES) y el tratamiento de bioestimulación con surfactante y D-limoneno (BESL), por lo tanto la adición de D-limoneno no ejerce un efecto significativo en la degradación de HTP según la prueba aplicada. Sin embargo existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos que poseen surfactante y los que no lo poseen (BS y B) y (BES y BE) por lo que se puede decir que este sí ejerce un efecto en la degradación de HTP. Con los resultados anteriores de



determinó que el mejor tratamiento para la biorremediación de suelo contaminado con crudo en condiciones anaerobias corresponde al tratamiento de Bioestimulación con surfactante (BES). Atagana et al y Zhang & Zhu (2003; 2012) muestran que los surfactantes como el Tween 80 mejora la degradación de hidrocarburos ya que son solubilizantes. Se determinó que el Tween 80 aumentó la biodisponibilidad de los hidrocarburos lo que facilita la biodegradación.

**Tabla 5-2**

*Porcentaje de degradación aplicando la prueba de Scheffé*

<b>Tratamiento Casos Media Grupos Homogéneos</b>			
AT	3	57,7	A
B	3	65,4	B
BS	3	69,2	C
BE	3	75,0	D
BELS	3	76,9	E
BES	3	76,9	E

Su, Zhou, Guo, Zhao, & Zhao (2012) reportan que la degradación de HAP en condiciones anaerobias incrementa con la adición de fuentes de carbono de fácil degradación como acetato y lactato. Liang et al (2014) reporta el mismo efecto, en su investigación las fuentes de carbono utilizadas fueron maltosa, glucosa, galactosa y sacarosa pasando de una biodegradación del 42,29% al 72,50, 45,59, 40,31 y 57,00% respectivamente. En la presente investigación se aplicó melaza como co-sustrato que al igual que las fuentes de carbono usadas en otras investigaciones como el acetato, lactato, maltosa, glucosa son de fácil degradación. La melaza fue añadida a los tratamientos de bioestimulación donde posiblemente se presentó el mismo proceso que reporta Su, Zhou, Guo, Zhao, & Zhao (2012) y esto condujo a obtener mayores porcentajes de degradación de los HTP. En este mismo estudio Su, Zhou, Guo, Zhao, & Zhao (2012) reportan un aumento en la degradación de HAP, este mismo resultado se obtuvo en la presente investigación. Ya que a los tratamientos de bioaumentación obtuvieron porcentajes de degradación de 65,4 y 69,2% los cuales fueron mayores al porcentaje obtenido en la atenuación natural (57,7%). Se debe recortar que en esta investigación los tratamientos de bioaumentación se les suministró el 10% de compost, misma cantidad reportada por Su, Zhou, Guo, Zhao, & Zhao (2012). En su investigación Su, Zhou, Guo, Zhao, & Zhao (2012) atribuye el aumento en la degradación de HAP al alto contenido de bacterias presentes en el compost.

Sun et al (2014) estudiaron la biodegradación de HAP en condiciones anaerobias. En este estudio se usó nitrato como aceptor final de electrones al igual que en la presente investigación. El mayor porcentaje de degradación encontrado en la investigación de Sun et al (2014) se obtuvo en el tratamiento con nitrato y metil-B-ciclodextrina, la cual es un agente solubilizante de compuesto orgánicos hidrofóbicos. Se puede ver que la función de la metil-B-ciclodextrina es similar a la función del Tween 80 que se emplea en esta

investigación. El porcentaje de degradación que reportan Sun et al (2014) fue de 61,7%, el cual es inferior al que se encontró en esta investigación y corresponde a 76,9%. Se debe resaltar que aunque los HAP presentan uno o varios anillos de Benceno en su molécula la concentración inicial de HAP es de 1290  $\mu\text{g/kg}$ , esta concentración es mucho menor a la que se empleó en la presente investigación (26000 mg/kg).

Bia, Davies, Albuquerque, & Randerson (2012) encontraron que en potenciales anoxicos y muy cercanos a los anerobias, las condiciones de desnitrificación pueden verse favorecidas al igual que la descomposición de compuesto orgánicos. Este resultado es obtenido en la presente investigación, donde se mostró que los tratamientos de bioestimulación presentan potenciales redox menores y que a su vez presentan menor concentración de HTP remanentes.

## 5.5. Caracterización fisicoquímica del suelo

Las muestras de suelo inicial y el correspondiente al mejor tratamiento (Tratamiento de Bioestimulación con surfactante) se caracterizaron fisicoquímicamente en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, los resultados se muestran en la en la materia orgánica. La disminución puede deberse al consumo de hidrocarburos que fueron consumidos en el proceso de biorremediación como lo reporta Trejos Delgado (2017). Los hidrocarburos por su naturaleza hidrofóbica se adhiere a la materia orgánica del suelo lo que provoca un aumento su valor.

En la tabla también se observar que los valores de nitrato y de ion amonio aumentaron drásticamente, esto es debido a la adición de nitrato de potasio como aceptor final de electrones y a la adición de urea como fuente de nitrógeno. Tanto el nitrato como el amonio pueden ser consumidos por los microorganismos, además el aumento de ellos compensa la relación C:N presente originalmente en el suelo. En la tabla Tabla 5-3 se puede observar un aumento en la cantidad de fósforo, es aumento puede explicarse ya que se agregó fosfato de potasio dibásico como fuente de este elemento. Se presenta también un aumento en la suma de cationes de cambio, esto se puede deber a la adición de Leonardita en este tratamiento.

### Tabla 5-3.

La Tabla 5-3 muestra que hubo una disminución en el porcentaje de arena entre el suelo inicial y el suelo del tratamiento de Bioestimulación con surfactante, mientras que el porcentaje de arcilla aumento entre los dos suelos ya mencionados. La diferencia entre los porcentajes tanto de arena como de arcilla pueden deber a la técnica empleada para determinar la textura del suelo (técnica de Bouyoucos) la cual se basa en la velocidad de sedimentación de las partículas. La velocidad de sedimentación de las partículas en ambos casos es afectada por los hidrocarburos adheridos a las partículas de los suelos, por lo cual se presentan diferencias en los porcentajes. Se puede observar que el

porcentaje de limo no cambió entre una medición y otra, resultados similares se presentan en la investigación realizada por Martínez M & López S., (2001)

Se puede observar que el pH en el suelo que corresponde al mejor tratamiento aumentó considerablemente, este aumento como ya se explicó se debe a la adición de urea como fuente de nitrógeno y a la adición de Leonardita, la cual posee un pH de 8,46. El valor elevado de parámetro no favorece el crecimiento de la mayoría de las plantas debido a que los nutrientes como Calcio, Magnesio, y Fósforo se encuentran en concentraciones aptas para ser asimilados por las plantas en pH entre 6 y 7 (Arias Jiménez, 2001; Bosques Vargas, 2010; Cabildo Mirando et al., 2013).

A partir de la caracterización de la muestra de suelo correspondiente al mejor tratamiento se puede observar una disminución del 2% en la materia orgánica. La disminución puede deberse al consumo de hidrocarburos que fueron consumidos en el proceso de biorremediación como lo reporta Trejos Delgado (2017). Los hidrocarburos por su naturaleza hidrofóbica se adhieren a la materia orgánica del suelo lo que provoca un aumento su valor.

En la tabla también se observa que los valores de nitrato y de ion amonio aumentaron drásticamente, esto es debido a la adición de nitrato de potasio como aceptor final de electrones y a la adición de urea como fuente de nitrógeno. Tanto el nitrato como el amonio pueden ser consumidos por los microorganismos, además el aumento de ellos compensa la relación C:N presente originalmente en el suelo. En la tabla Tabla 5-3 se puede observar un aumento en la cantidad de fósforo, este aumento puede explicarse ya que se agregó fosfato de potasio dibásico como fuente de este elemento. Se presenta también un aumento en la suma de cationes de cambio, esto se puede deber a la adición de Leonardita en este tratamiento.

**Tabla 5-3**

*Propiedades fisicoquímicas del suelo inicial y mejor tratamiento*

<b>Características</b>	<b>Suelo inicial</b>	<b>Suelo tratamiento BES</b>
Arena (%)	78	68
Limo (%)	12	12
Arcilla (%)	10	20
Clase	Franco Arenoso	Franco Arenoso
Densidad real (g/cm <sup>3</sup> )	2,18	2,7
Humedad (%)	18	48
pH	5,9	8,9
Materia orgánica (%)	16,9	14,9
CICE	7,2	96
Fósforo (mg/Kg)	17	208
N-NO <sub>3</sub> (mg/Kg)	1	1475
N-NH <sub>4</sub> (mg/Kg)	17	602

Nitrógeno total (%)	0,29	1,39
Hidrocarburo presente (ppm)	26000	6000

Nota: Modificado de Informe de Laboratorio

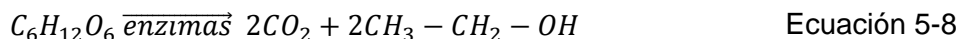
## 5.6. Patrón de emisión de gases en los microcosmos

A continuación se presenta una de las tres réplicas de los patrones de emisiones de los diferentes gases en los tratamientos y su posible origen.

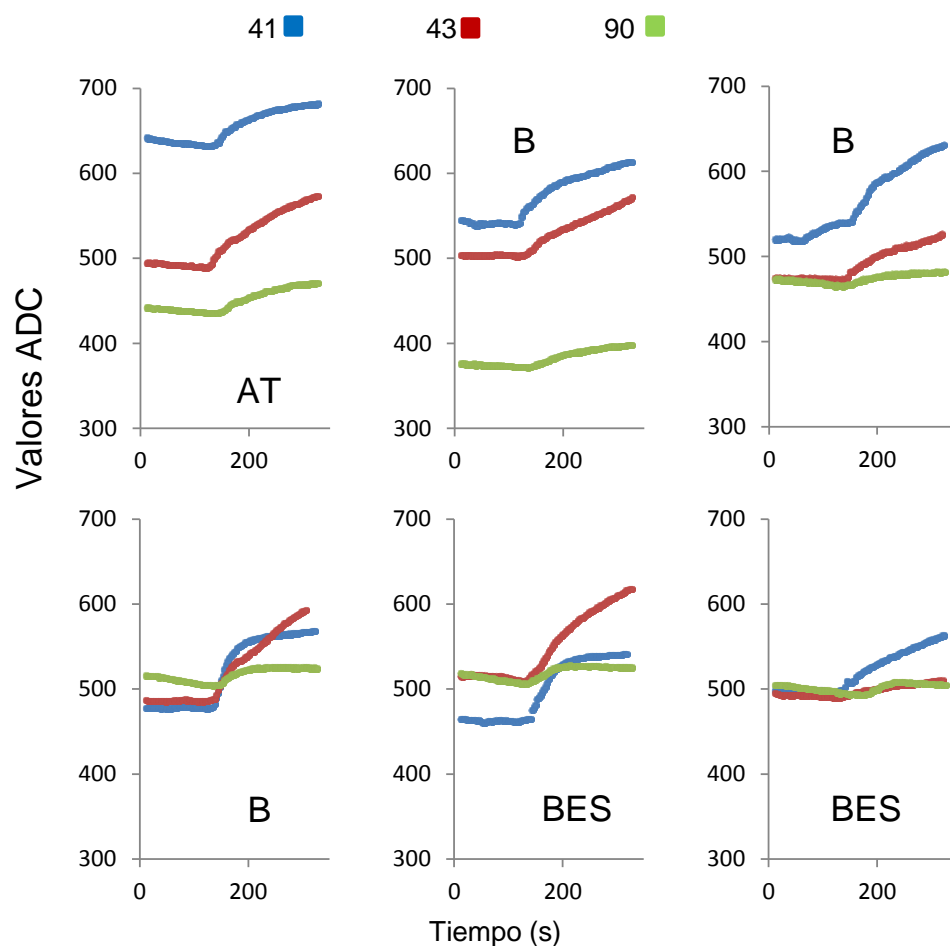
Se realizaron tres mediciones con SENose, una primera medición antes de agregar nutrientes (día 41), la segunda se realizó un día después de agregar nutrientes (día 43) y una tercera medición al final del tratamiento (dos semanas después de no agregar nutrientes, día 90). En el Anexo C puede observarse las figuras obtenidas por el dispositivo SENose.

### Sensor MQ-3 sensible a Alcohol

La generación de alcohol en los tratamientos de biorremediación anaerobia se da por la fermentación alcohólica. La fermentación alcohólica es producto de la actividad de bacterias fermentadoras como *Enterobacterias*. La adición de melaza en los tratamientos de bioestimulación aumenta los procesos fermentativos debido a que la melaza posee más del 60% de azúcares. Los productos de la fermentación alcohólica son alcohol y dióxido de carbono (Koneman & Allen, 2008) como se muestra en la Ecuación 5-8

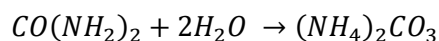


En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra el patrón de emisión de Alcohol en los tratamientos de Biorremediación, en los tratamientos de Atenuación Natural (AT), Bioaugmentación (B) y Bioaugmentación con surfactante (BS) se observa una disminución en el tiempo de la cantidad de alcohol producido en los microcosmos debido a que no se aplicó ningún tipo de azúcar en estos tratamientos, por el contrario en los tratamientos de Bioestimulación (BE), Bioestimulación con surfactante (BES) y Bioestimulación con surfactante y D-Limoneno (BESL) se observa un aumento en la cantidad de alcohol en la segunda medición, esto se debe a en el día 43 se aplicó enmienda a estos tratamientos. En los seis tratamientos que poseen actividad biológica se observa un aumento en la pendiente después de realizada la estimulación mecánica, lo que indica que los gases se liberaron de manera más rápida a partir de este momento.

**Figura 5-8** Patrón de emisión de Alcohol en los microcosmos**Sensor MQ137 sensible a Amoniaco**

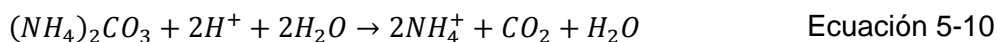
La producción de amoniaco en el suelo se da por la adición de urea como fuente de nitrógeno en los tratamientos de bioestimulación (BE, BES, BESL). En las figuras del Anexo C puede observarse como cambia la pendiente en los tratamientos. Es notorio que en los tratamientos de bioestimulación la producción de amoniaco es mayor a la producción en los tratamientos de bioaumentación.

El amoniaco es generado a partir de la urea que al ser incorporada al suelo sufre un proceso de hidrólisis, el cual es catalizado por la enzima ureasa producida por los microorganismos del suelo (Atlas & Bartha, 2002; Navarro García & Navarro García, 2014). La hidrólisis de la urea produce carbonato de amonio como se muestra a continuación:

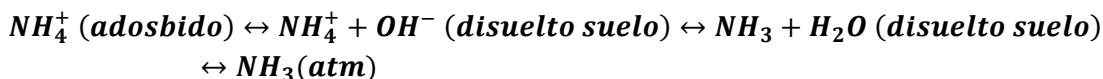


Ecuación 5-9

El carbonato de amonio es inestable y se descompone en amoníaco y dióxido de carbono. La reacción se muestra a continuación.

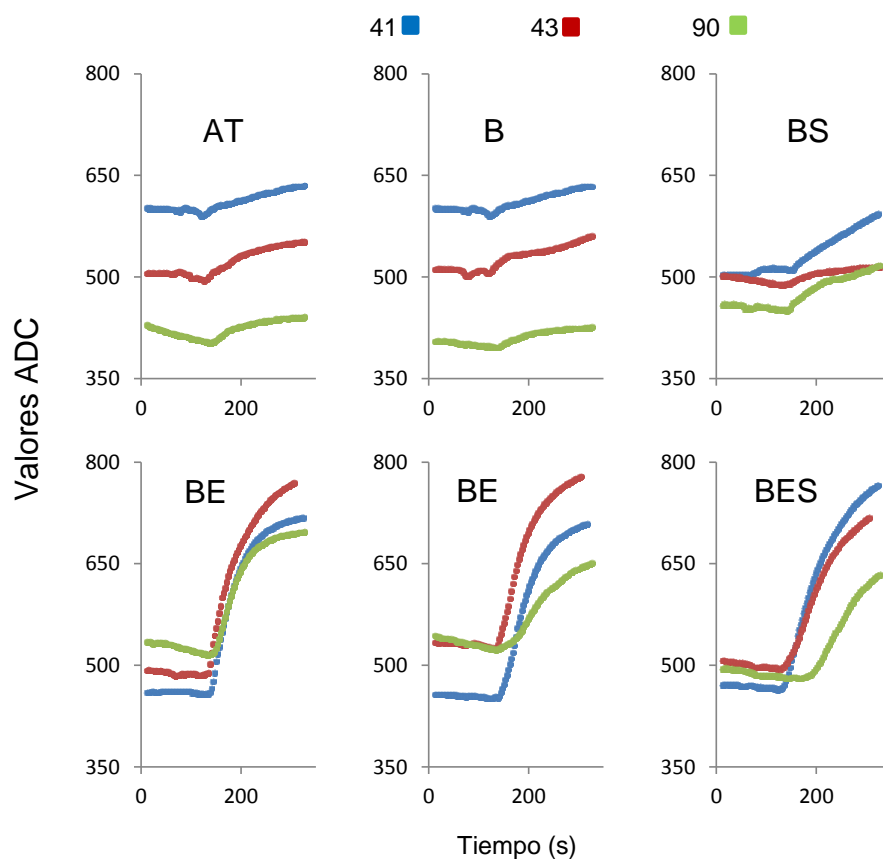


El amonio que se libera en el proceso de hidrólisis de la urea queda en equilibrio con el amoníaco de la atmósfera como se muestra.



La volatilización del amoníaco es afectado por la actividad ureásica, la temperatura, el contenido de agua, el pH, la capacidad de intercambio catiónico y el intercambio gaseoso (Atlas & Bartha, 2002; Navarro García & Navarro García, 2014).

En la Figura 5-9 se muestra el patrón de emisión de Amoníaco en los tratamientos de Biorremediación, aquí se puede apreciar el mismo comportamiento mostrado en el patrón de emisión de Alcohol, donde se observa una disminución a través del tiempo en los tratamientos de Atenuación Natural (AT), Bioaumentación (B) y Bioaumentación con surfactante (BS) mientras que en los tratamientos de Bioestimulación (BE), Bioestimulación con surfactante (BES) y Bioestimulación con surfactante y D-Limoneno (BESL) se observa un aumento en la cantidad de Amoníaco, lo que concuerda con la aplicación de enmienda en estos tratamientos. Al igual que en el caso anterior se observa un cambio en la pendiente después de realizada la estimulación mecánica del suelo, especialmente en los tratamientos de Bioestimulación.

**Figura 5-9** Patrón de emisión de Amoniaco en los microcosmos

### Sensor MQ-135 Óxidos de nitrógeno

El sensor MQ-135 no posee gran especificidad, ya que es sensible a varios gases como amoníaco, óxidos de nitrogenados, alcohol, benceno y dióxido de carbono, este último se produce en los procesos de fermentación alcohólica, estabilización del carbonato de amoníaco (ver Ecuación 5-10) y los procesos de metabólicos por el consumo de los hidrocarburos presentes en las muestras.

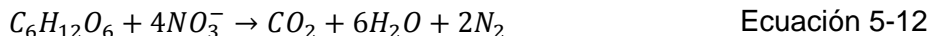
Se debe recordar que todos los tratamientos, incluso la atenuación natural les fueron agregado nitrato de potasio. Al encontrarse en una solución acuosa el nitrato de potasio se disocia en  $K^+$  y  $NO_3^-$ . En ausencia de oxígeno como es el caso de los tratamientos el ion nitrato actúa como aceptor final de electrones.

De la literatura se sabe que existen dos tipos de respiración de nitratos. Bacterias como "*Alcaligenes*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Spirillum*, *Staphylacoccus* y *Vibrio* las cuales reducen el nitrato a nitrito en condiciones anóxicas" (Atlas & Bartha, 2002). Estos microorganismos en condiciones apropiadas pueden reducir el nitrito a amonio sin embargo no son des nitrificadoras puesto que no producen nitrógeno gaseoso. Mientras que los microorganismos "como *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillues denitrificans*" (Atlas & Bartha, 2002) reducen el nitrato a nitrito,

pasando a óxido nítrico, óxido nitroso y por último a nitrógeno molecular como se muestra Ecuación 5-11.



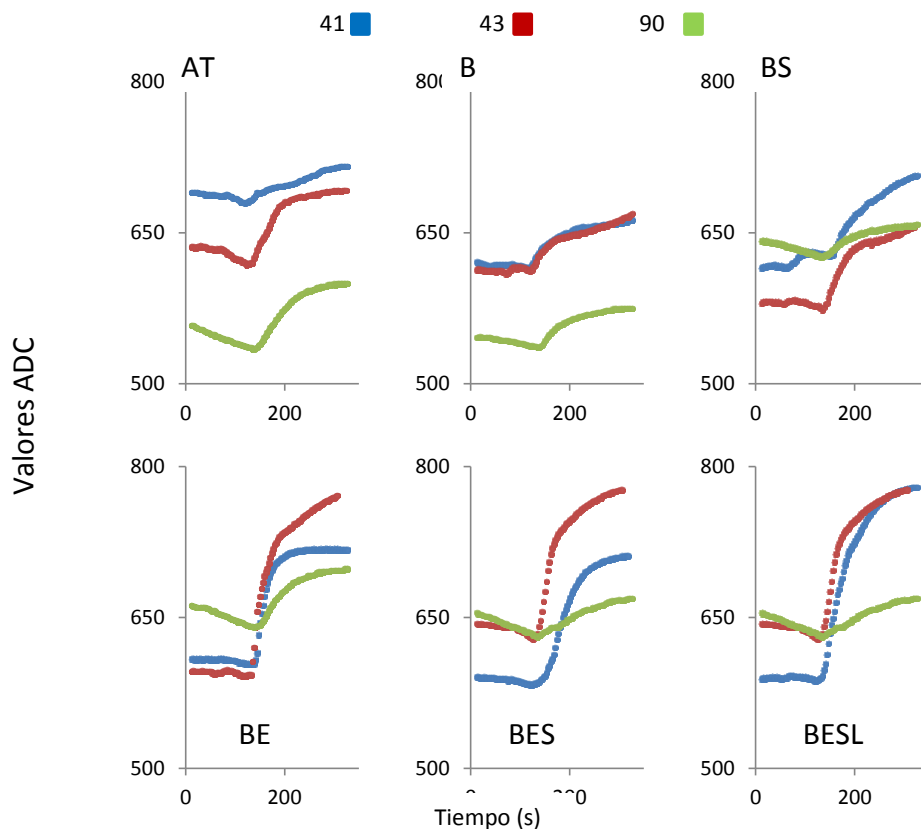
Las *Pseudomonas* también pueden ser desnitrificadores y en la presencia de glucosa estas pueden generar agua, dióxido de carbono y nitrógeno como se muestra en la Ecuación 5-12



La aparición de amoníaco en las muestras es explicada en el sensor MQ-137 y el alcohol en el sensor MQ-3.

En la Figura 5-10 se observa el patrón de emisión de Óxidos de Nitrógeno en los microcosmos, en esta figura se observa un patrón similar a los anteriores, donde la concentración del gas disminuye a través del tiempo para los primeros tres tratamientos, mientras que se observa un aumento en la segunda medición para los tres tratamientos finales, este comportamiento se lo atribuye a la adición de nutrientes y melaza.

**Figura 5-10** Patrón de emisión de Óxidos de Nitrógeno





### Sensor MQ-136 sensible a ácido Sulfuro de Hidrógeno

"El azufre es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. En los organismos vivos, el azufre se encuentra principalmente formando grupos sulfhidilo en los aminoácidos y sus polímeros"(Atlas & Bartha, 2002). Se ha encontrado en la literatura que microorganismos como *Thiobacillus denitrificans* pueden usar los iones de nitrato como aceptor final de electrones en la oxidación de los compuestos inorgánicos del azufre como se muestra en Ecuación 5-13.



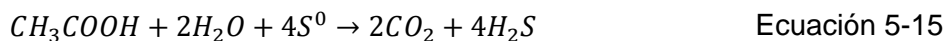
Sin embargo *Thiobacillus denitrificans* sin no realizar la reducción asimilatoria de nitrato y necesita amonio como fuente de nitrógeno.

Otros microorganismos como *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* son reductores de sulfatos la cual produce sulfuro de hidrógeno como muestra la Ecuación 5-14



Se puede ver en las Ecuación 5-13 y Ecuación 5-14 que los productos de unas reacciones pueden ser los reactivos de otra, lo cual en la naturaleza es muy importante.

Otros géneros como *Desulfuromonas acetoxidans* crece a partir de acetato, reduciendo anaeróbicamente cantidades estequiométricas de S a H<sub>2</sub>S como se muestra en la Ecuación 5-15



"Se ha descubierto que algunas especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y de *Saccharomyces* liberan sulfuro de hidrógeno a partir de sulfatos"(Atlas & Bartha, 2002).

Se sabe que la reducción de sulfatos se puede dar en un diferentes rangos de pH, presión temperatura y salinidad.

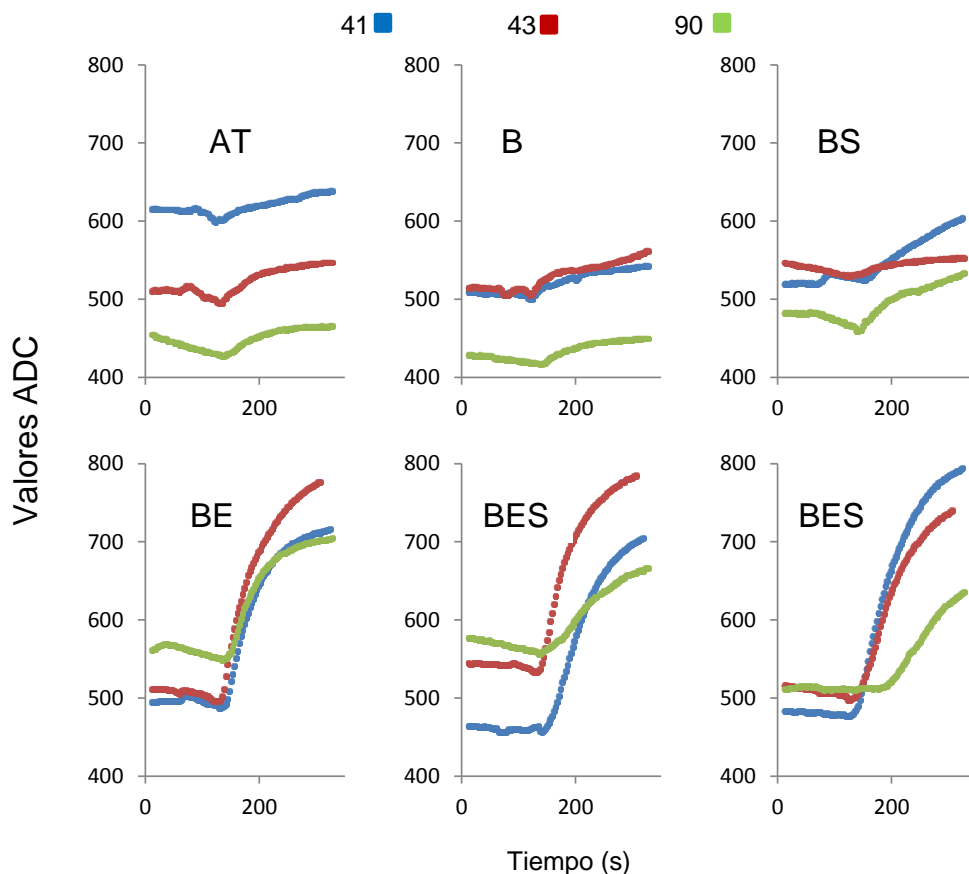
Se debe tener en cuenta que no solo los procesos aquí explicados pueden ocurrir en los tratamientos de biorremediación, procesos como la acetogénesis también se pueden dar en el ambiente de los microcosmos. En la acetogénesis intervienen microorganismos anaerobios facultativos que reducen el CO<sub>2</sub> con H<sub>2</sub> y producen acetato, ejemplos de microorganismos que pueden llevar a cabo esta reacción es *Clostridium thermoaceticum* y *Acetobacterium woodii*.



En la Figura 5-11 se observa el patrón de emisión del Sulfuro de Hidrógeno en los tratamientos de biorremediación donde se presenta la misma tendencia de los gases anteriores para los tratamientos de Atenuación Natural, Bioaumentación y

Bioestimulación, tanto en la cantidad de gas como en el aumento de la pendiente después de la estimulación mecánica. Este comportamiento se atribuye una vez más a la aplicación de la enmienda.

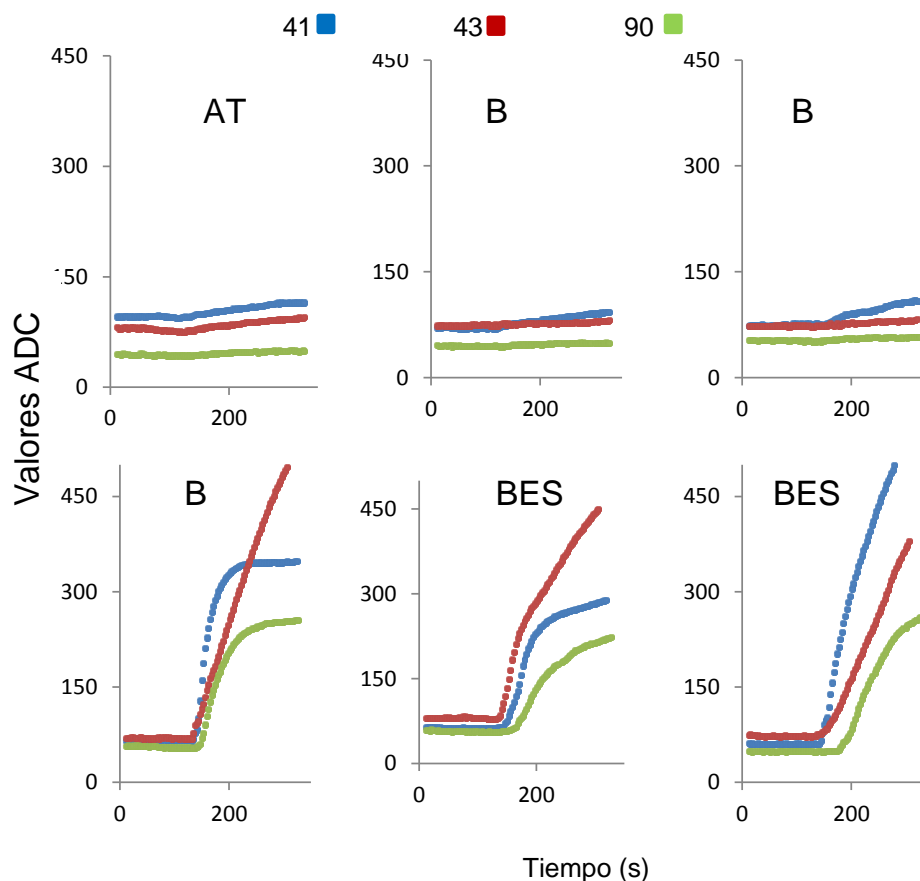
**Figura 5-11** Patrón de emisión de Sulfuro de Hidrógeno en los microcosmos



### Sensor MQ-7 sensible a Monóxido de Carbono

"La fuente más importante de CO es la oxidación fotoquímica del metano y de otros hidrocarburos en la atmosfera" (Atlas & Bartha, 2002). Biológicamente, el monóxido de carbono aparece durante la respiración animal y microbiana en cantidades traza (Atlas & Bartha, 2002).

En la Figura 5-12 se muestra el patrón de emisión del Monóxido de Carbono en los microcosmos, en la figura se puede observar un patrón similar al de los anteriores gases para los diferentes tratamientos. Sin embargo se puede observar una gran diferencia entre los tratamientos de Atenuación Natural, Bioaumentación y los tratamientos de Bioestimulación a pesar de haberse mantenido en las mismas condiciones (alejados de la luz solar), lo que sugiere que el Monóxido de Carbono producido en estos últimos se debe a la respiración microbiana, la cual se ve favorecida por la aplicación de nutrientes y enmienda.

**Figura 5-12** Patrón de emisión de Monóxido de Carbono en los microcosmos

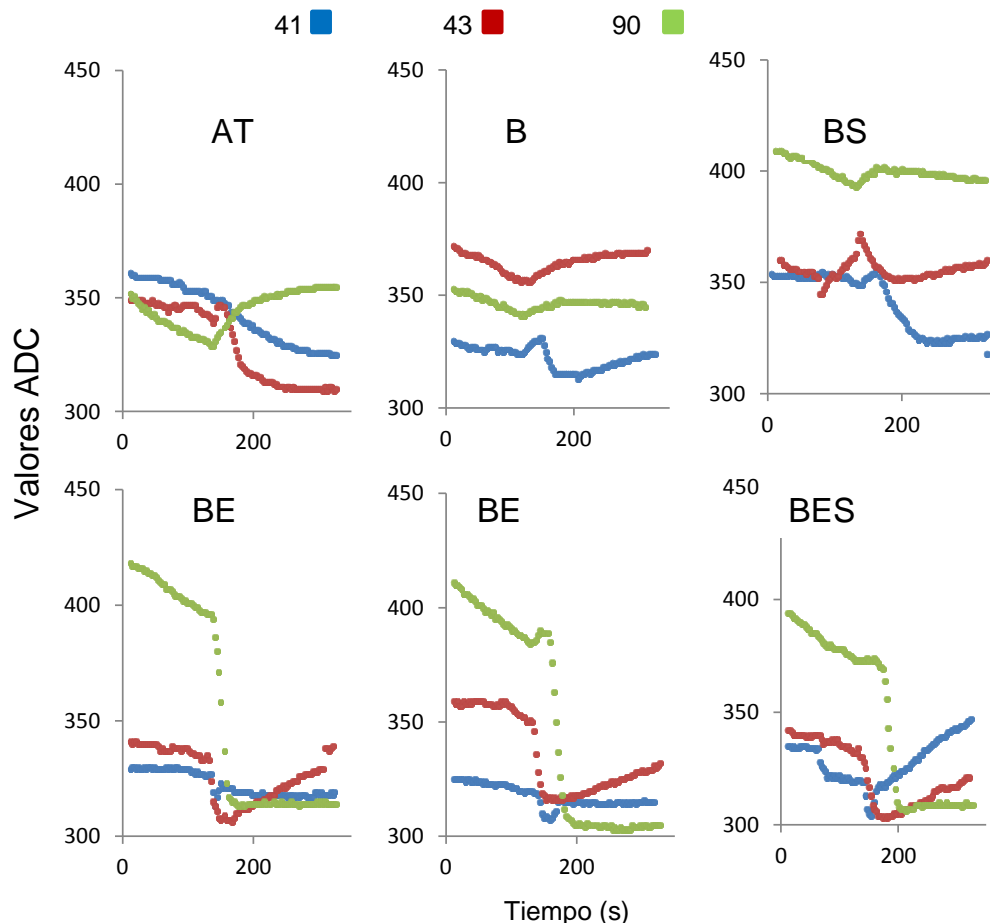
### Sensor MQ-4 sensible a Metano, gas natural y una pequeña sensibilidad a alcohol y humo

La metanogénesis se da por un grupo exclusivo de arqueas anaerobias y que están activos a potenciales redox entre -350 mV y -450 mV (Atlas & Bartha, 2002).

La Figura 5-13 muestra el patrón de emisión del Metano en los tratamientos de biorremediación, en este caso se presente un comportamiento opuesto al mostrado por los gases anteriores, en este caso se presentan mayores concentraciones de Metano a medida que aumenta el tiempo, esto se debe a que este gas se produce en condiciones altamente reducidas como se dijo anteriormente por este motivo se debe esperar que los microcosmos alcancen estas condiciones. En la Figura 5-1 se mostró el comportamiento del Potencial Redox en los microcosmos durante el tratamiento de Biorremediación, sin embargo según las medidas realizadas no se alcanzaron condiciones altamente reducidas donde se da la metanogénesis, sin embargo es posible que estas condiciones se presenten en agregados del suelo donde el potencial redox haya alcanzado valores muy

bajos. En la figura también se observa que hay una disminución en la concentración del gas sobre todo en las tratamientos de Bioestimulación, esto se puede deber a la absorción de Metano en el suelo como lo sugiere en su investigación. Born, Dörr, & Levin (1989) donde encontraron que los flujos de metano en el suelo estaban controlados por la resistencia en el transporte más que por la actividad de los microorganismos en el suelo.

**Figura 5-13** Patrón de emisión de Metano



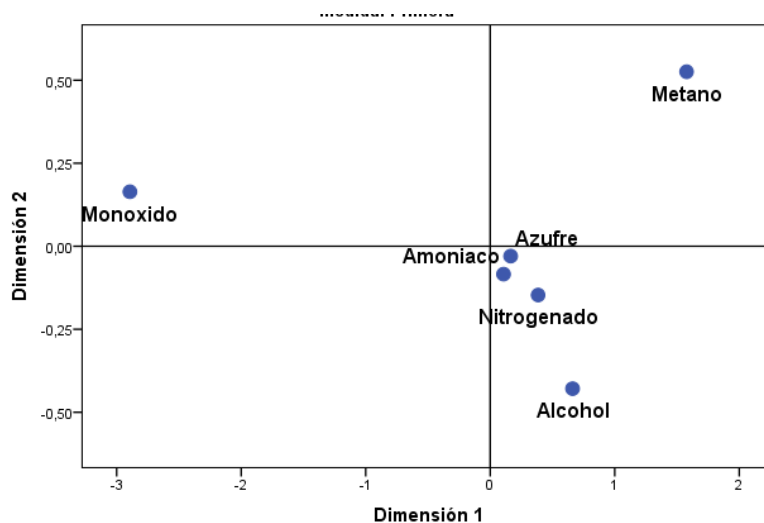
### Análisis de escalado multidimensional

En análisis de escalado multidimensional es una técnica que permite representar espacialmente un conjunto de estímulos. De esta manera con el escalado multidimensional se representa en un mapa un conjunto de objetos de tal forma que aquellos que se encuentren cerca indican que son percibidos de forma semejante mientras que aquellos objetos que se encuentran alejados entre sí indican que los objetos no son percibidos como semejantes.

Se realizó el análisis de escalamiento multidimensional para los diferentes tratamientos y se los agrupó teniendo en cuenta el día en que se realizó la medida. La primera medida

corresponde a la lectura de gases que se realizó el día 41 del tratamiento de biorremediación, la segunda medida corresponde a la lectura efectuada en día 43 y la tercera medida corresponde a la lectura del día 90. El análisis de escalamiento multidimensional se realizó en el programa IBM SPSS Statistics 23. Con el fin de visualizar mejor los nombres en las figuras, se llamó *Nitrogenados* a los gases detectados por el sensor MQ-135, *Azufre* al gas detectado por el sensor MQ-136 el cual detecta sulfuro de hidrógeno y *Monóxido* al gas detectado por el sensor MQ-7 que detecta Monóxido de Carbono. Se puede observar en las *Figura 5-14* a *Figura 5-16* la cercanía del Amoniaco, Azufre, Nitrogenados y Alcohol. La cercanía de estos gases coincide con la proximidad encontrada en las gráficas de las detecciones de los gases después de normalizarse.

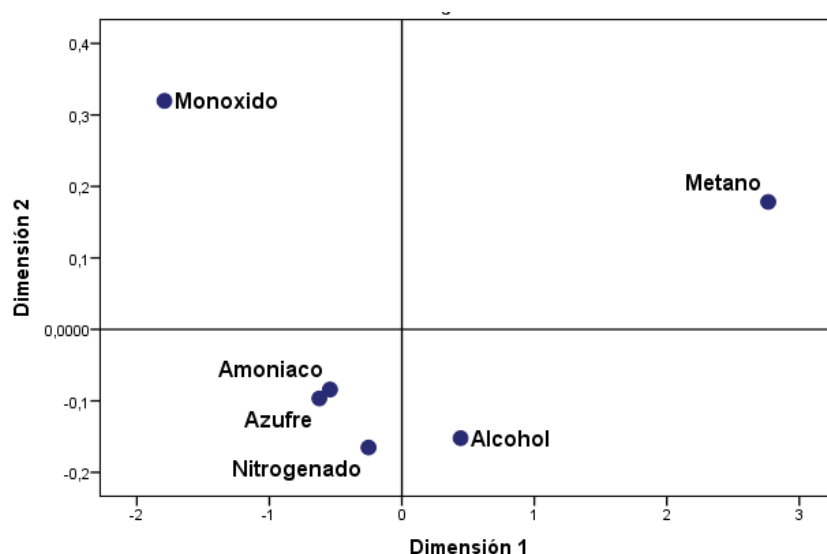
En la *Figura 5-14* se muestran tres grupos. El primero de ellos formado por el Monóxido, un segundo grupo formado por Amoniaco, Azufre, Nitrogenados y Alcohol y un tercer grupo en el que se encuentra el Metano. Si la Dimensión 1 corresponde a un gradiente de estados de óxido reducción, donde -3 corresponde a la parte más oxidada y 2 la más reducida se tiene que el Metano se encuentra en el extremo derecho, lo cual es consistente ya que este gas se genera en condiciones muy reducidas, entre -350mV y -400mV. Al Metano le siguen el Alcohol, Nitrogenados, Azufre y Amoniaco, los cuales se producen en el proceso de fermentación y condiciones de oxígeno bajas respectivamente. Finalmente se tiene el Monóxido del cual se encuentra en el extremo izquierdo por lo que posiblemente es el resultado de la oxidación fotoquímica o el resultado de la respiración de los microorganismos.



**Figura 5-14** Análisis multidimensional para la primera detección de gases (día 41)

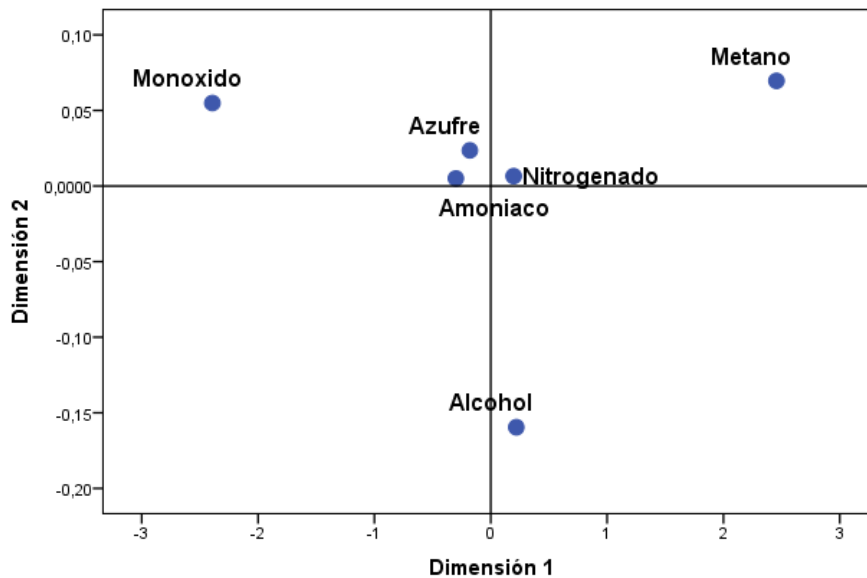
La *Figura 5-15* presenta un comportamiento diferente al mostrado en las *Figura 5-14* y *Figura 5-16*. Se puede observar que el Amoniaco, Azufre y Nitrogenado se desplazaron hacia la parte izquierda de la Dimensión 1. Este desplazamiento indica que la detección de los gases se da en un estado oxidado. El cambio en los estados de oxidación

reducción presentados este día posiblemente se deban a la presencia de oxígeno molecular en los microcosmos. La presencia de oxígeno molecular se presenta debido a que es necesario abrir los microcosmo cuando se aplican la enmienda con lo que se expone a la atmósfera permitiendo la entrada de oxígeno



**Figura 5-15** Análisis multidimensional para la segunda detección de gases (día 43)

En la *Figura 5-16* se tiene un comportamiento similar en la Dimensión 1 al que se presenta en la *Figura 5-14*, donde se conserva el orden en los estados de oxidación reducción. Con el Monóxido en la parte izquierda, seguido del grupo conformado por Amoníaco, Azufre, Nitrogenado y Alcohol en la parte central, mientras que el Metano se encuentra en la parte derecha. Sin embargo se puede observar que en la dimensión 2 el Alcohol se encuentra en la parte inferior mientras que la los otras gases se ubican en la parte superior. Esta organización indica la posible existencia de otro gradiente, este no es discutido en esta investigación.



**Figura 5-16** Análisis multidimensional para la tercera detección de gases (día 90)

## 5.7. Formulación del plan de manejo ambiental para biorremediación suelos contaminados con Hidrocarburos

La gestión ambiental está constituida por el componente del medio humano y por el componente del medio natural en cuanto a vectores que modifican al mismo. Se denominan impactos ambientales a las modificaciones que se hacen al medio natural y al medio humano, los impactos ambientales se identifican, evalúan, previenen, mitigan o compensan. Este conjunto componen el objetivo de la gestión ambiental (Angel Sanint, Carmona Maya, & Villegas R., 2010).

Cuando se plantea un protocolo ambiental donde se involucra tecnología de biorremediación para tratar suelos contaminados con hidrocarburos, el protocolo debe tener medidas que permitan reducir y controlar el riesgo al medio ambiente, además de elementos normativos, sociales y técnicos.

### Revisión ambiental inicial

La primera etapa que se realiza en la formulación de un plan de manejo ambiental es la investigación del medio afectado mediante trabajo de campo donde se delimita el lugar contaminado, se determina la fuente de contaminación, se identifican los receptores, se determina la posible ruta de migración del contaminante, las vías de exposición, se realiza el análisis de riesgo, se establecen los referentes normativos, se establecen los costos ambientales, las medidas de gestión y el plan de monitoreo.

**Delimitación del lugar**

El plan de gestión ambiental tiene la obligación de considerar todo el suelo contaminado con hidrocarburos. La delimitación del lugar se realiza mediante de muestreos y análisis químicos, los cuales permiten identificar la concentración y la extensión de los hidrocarburos presentes en el sitio. Las autoridades ambientales tienen niveles establecidos de la concentración de hidrocarburos permitidos en el suelo. Por lo tanto la concentración de hidrocarburos en el suelo depende de la normativa local. De acuerdo resolución 1170 de 1997 del DAMA los niveles permitidos de HTP para bajo y mediano impacto son 10.000 ppm y 1.000 ppm respectivamente.

**Fuente de contaminación**

La determinación de la fuente del hidrocarburo es fundamental ya que permite determinar hacia dónde se dirige la pluma de contaminación, de la misma manera permite acabar con el flujo ya que la mayoría de los derrames de hidrocarburos se debe atentados contra a la infraestructura petrolera ya sea a oleoductos o carro tanques.

**Receptores**

Se debe identificar a los posibles receptores ya sean comunidades, asentamientos humanos o ecológicos como suelo, agua, fauna y flora que se encuentren en las zonas cercanas al lugar afectado por la contaminación.

**Ruta de migración del contaminante**

La composición química del contaminante proporciona datos sobre el comportamiento de migración del mismo. En el caso de los hidrocarburos, la solubilidad en agua es baja por lo tanto poco probable que se generen migraciones hasta el agua subterránea, sin embargo al ser menos denso que el agua tiende a quedarse en la superficie y migrar fácilmente en corrientes de agua mientras que si estos se encuentran en el suelo, los hidrocarburos se adhieren a la matriz del suelo.

**Vías de exposición**

Se identifican las vías de exposición más notables. En el caso de los hidrocarburos las vías de exposición pueden ser por inhalación de vapores constituidos por compuestos volátiles, contacto dérmico, riesgo eco toxicológico.

**Análisis de riesgo ambiental**

El riesgo ambiental involucra la posibilidad de ocurrencia de un accidente y las consecuencias negativas en el entorno natural, humano y socioeconómico. El riesgo ambiental se calcula mediante la Ecuación 5-17 para las propiedades físicas del petróleo.

.



$$Riesgo = \frac{Probabilidad \times consecuencia}{Frecuencia}$$

Ecuación 5-17

Se debe tener en cuenta que para la aplicación de esta metodología se debe tener claridad de los posibles escenarios en los que se analizan los riesgos de cualquier proyecto.

### Estimación de la probabilidad

Teniendo en cuenta la norma UNE 150008 EX, se asigna la probabilidad de ocurrencia en según de los criterios de la Tabla 5-4

**Tabla 5-4**

*Estimación de la Probabilidad*

Valor	Probabilidad
5	Muy probable > una vez al mes
4	Altamente probable > una vez al año < una vez al mes
3	Probable > una vez cada 10 años < una vez al año
2	Posible > una vez cada 50 años < una vez cada 10 años
1	Improbable > una vez cada 50 años

Nota: Tomado de(Greenleaf Ambiental Company, 2011) En base a Norma UNE 150008-2008 - Evaluación de riesgos ambientales

### Estimación de la consecuencia

La estimación de la consecuencia se hace tanto para el entorno natural, humano y socioeconómico. Para el cálculo del valor de las consecuencias en los diferentes entornos se emplea la Tabla 5-5

**Tabla 5-5**

*Estimación de la Gravedad de las consecuencias*

Gravedad del entorno natural	Cantidad + 2 peligrosidad + extensión	calidad del medio
Gravedad del entorno humano	Cantidad + 2 peligrosidad + extensión	Población afectada
Gravedad del entorno socioeconómico	Cantidad + 2 peligrosidad + extensión	Patrimonio y capital productivo

Nota: Tomado de(Greenleaf Ambiental Company, 2011)

Donde la cantidad se refiere a la cantidad de sustancia que se encuentra en el entorno, la peligrosidad se evalúa en función de la peligrosidad intrínseca de la sustancia, esta puede ser toxicidad, acumulación, etc. La extensión hace referencia a la influencia del

impacto en el entorno. En la calidad del medio se considera el impacto la reversibilidad del mismo. La población afectada toma el número de personas afectadas. El patrimonio cultural y productivo hace referencia a la valoración del patrimonio tanto económico como social. La valoración de los anteriores criterios sobre cada entorno puede verse en las Tabla 5-6 a Tabla 5-8 cuando solo se tiene en cuenta las propiedades físicas del petróleo.

**Tabla 5-6***Entorno Natural*

Valor	Cantidad	Peligrosidad	Extensión	Calidad del Medio
4	Muy alta	Muy peligrosa	Muy extenso	Muy elevada
3	Alta	Peligrosa	Extenso	Elevada
2	Poca	Poco peligrosa	Poco extenso	Media
1	Muy poca	No peligrosa	Puntual	Baja

Nota: Tomado de(Greenleaf Ambiental Company, 2011)

**Tabla 5-7***Entorno humano*

Valor	Cantidad	Peligrosidad	Extensión	Población afectada
4	Muy alta	Muerte o efectos irreversibles	Muy extenso	Más de 100
3	Alta	Daños graves	Extenso	Entre 25 y 100
2	Poca	Daños leves	Poco extenso	Entre 5 y 25
1	Muy poca	Daños muy leves	Puntual	< 5 personas

Nota: Tomado de(Greenleaf Ambiental Company, 2011)

**Tabla 5-8***Entorno socioeconómico*

Valor	Cantidad	Peligrosidad	Extensión	Patrimonio y capital productivo
4	Muy alta	Muy peligrosa	Muy extenso	Muy alto
3	Alta	Peligrosa	Extenso	Alto
2	Poca	Poco peligrosa	Poco extenso	Bajo
1	Muy poca	No peligrosa	Puntual	Muy bajo

Nota: Tomado de(Greenleaf Ambiental Company, 2011)

Cuando los hidrocarburos presentes en el petróleo correspondan a Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos, los cuales poseen propiedades cancerígenas el análisis de riesgo que se propone en esta investigación es el descrito en el método Holandes *CSoil*, el cual calcula los riesgos a la salud humana. Las siguientes ecuaciones son para ingestión de suelo, contacto dérmico e ingestión de agua respectivamente

$$HQ_{\text{ingestión de suelo}} = \frac{AID_n C_s F_a}{BW_n MPR} \quad \text{Ecuación 5-18}$$

$$HQ_{\text{contacto dérmico}} = \frac{DARR_n C_s F_a F_m}{BW_n MPR} A1 \quad \text{Ecuación 5-19}$$

$$A1 = (AEXP_{nin} DAE_{nin} TB_{in} FRS_{in} + AEXP_{nex} DAE_{nex} TB_{nex}) \quad \text{Ecuación 5-20}$$

$$HQ_{\text{ingestión de agua}} = \frac{QDW_n C_s F_a LP SD D_{ag.constant}}{BW_n MPR} A2 \quad \text{Ecuación 5-21}$$

$$A1 = \frac{Z_{ag}}{Z_{ai} V_{ai} + Z_{ag} V_{ag} + K_s SD Z_{ag}} \quad \text{Ecuación 5-22}$$

"Donde  $AID_n$  es la ingesta diaria de suelo de un niño,  $F_a$  es el factor de absorción relativa,  $MPR$  es el riesgo máximo permisible,  $DAR_n$  es la velocidad de absorción dérmica de un niño,  $F_m$  es el factor de absorción dérmica de la matriz,  $AEXP_{nin}$  y  $AEXP_{nex}$  son las superficies de la piel de un niño expuesta interna y externa respectivamente,  $TB_{nin}$  y  $TB_{nex}$  son el periodo de exposición al contacto con suelo interno y externo respectivamente,  $FRS_{in}$  es la fracción de suelo interno cubierta de polvo,  $QDW_n$  es la velocidad de absorción dérmica en niños,  $D_{ag, constant}$  es la constante de ingestión de agua,  $D_{pe}$  es el coeficiente de permeado del polietileno,  $LP$  es el diámetro de la zona contaminada,  $SD$  es la densidad neta del suelo seco,  $Z_{ai}$  y  $Z_{ag}$  son las constantes de fugacidad en el aire agua respectivamente y finalmente  $V_{ai}$  y  $V_{ag}$  son las fracciones de volumen de agua y aire respectivamente" (Alonso Pinedo, 2014)

### Referentes normativos

En 1970 se creía que el suelo tenía una capacidad de autodepuración casi infinita por lo cual no se hablaba de contaminación de suelos, pero en 1972 se clasificó al suelo como un recurso limitado y con facilidad de destruirse por lo cual debe ser protegido. Las acciones que se tomaron para la protección del suelo fueron aumentando a través del tiempo, en 1992 en la Cumbre de Río "donde se reconoció la importancia de la protección del suelo y de sus usos potencial en el contexto de desarrollo sostenible" (Silva Arroyave & Correa Restrepo, 2009), en 1994 la Convención de las Naciones Unidas estableció como objetivo "evitar y reducir la degradación del suelo" (Silva Arroyave & Correa Restrepo, 2009). A continuación se listan algunas leyes y decretos relacionados con la protección del suelo, medio ambiente y residuos peligrosos como los hidrocarburos.

**Tabla 5-9**

*Normatividad ambiental en Colombia de protección del suelo y regulación de sustancias químicas peligrosas*

<b>Norma</b>	<b>Contenido</b>
Decreto Ley 2811 de 1974	Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente "considera al medio ambiente como un patrimonio común y un bien sujeto de protección y tutela jurídica" por lo cual el estado y la comunidad en general deben hacerse partícipes en la preservación y manejo de este.
Ley 23 de 1973	Por la cual se busca prevenir y controlar la contaminación al medio ambiente además de su conservación y restauración.
Artículo 80 de la Constitución Política	Por el cual el Estado planifica el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales
Resolución 0170 de 2009	Por el cual Colombia adopta medidas para la conservación y protección de los suelos en el territorio nacional.
Ley 1252 de 2008	Por la cual establecen las normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los residuos y desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones
Decreto 1521 del 4 de agosto de 1998	Por el cual se establece el reglamento de almacenamiento, manejo, transporte y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo, para estaciones de servicio
Decreto 321 de 1999	Por la cual se adopta el Plan Nacional de Contingencia contra derrames de Hidrocarburos, Derivados y Sustancias Nocivas.
Decreto 283 de 1990	Por la cual se reglamenta el almacenamiento, manejo, transporte y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo y el transporte por carrotanques de petróleo crudo.

### Medida de gestión

Para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos existen alternativas físicas, químicas y biológicas. Los tratamientos físicos y químicos generalmente tienen un alto costo sin embargo se ejecutan de manera rápida, no obstante causan gran cantidad de impactos ambientales negativos. En los últimos años han tomado gran fuerza los tratamientos biológicos por ser eficientes y generan menores impactos ambientales. En este trabajo después de evaluar el porcentaje de degradación de hidrocarburos totales del petróleo mediante la técnica de bioaumentación y bioestimulación se decidió seleccionar la bioestimulación esta técnica consiste en agregar nutrientes al suelo para estimular las poblaciones nativas y mejorar la degradación de estos componentes.

Para un desarrollo adecuado de la biorremediación se debe tener presente parámetros como los que se muestra en la Tabla 5-10

**Tabla 5-10**

*Parámetros que influyen en la bioestimulación*

Parámetros	Rango optimo
pH	6 - 8
Temperatura	20 – 40 °C
Humedad	25 y 75% de la capacidad de campo
Biomasa	$10^3$ - $10^4$ UFC/g
Nutrientes	100:12:2 a 100:2:0.2

Nota: Tomado de (Prada Vásquez, 2016)

### Costos gestión ambiental

Los costos para la implementación del tratamiento de biorremediación dependen de factores como la cantidad del suelo contaminado que se requiere tratar, el costo de nutrientes, la disponibilidad de equipos para monitorear los parámetros de la biorremediación y costo de tratamientos previos para condicionar el suelo.

### Implementación de la medida de gestión

Para que el tratamiento de biorremediación sea eficaz se debe identificar de ante mano los factores que condicionen el proceso, como las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo. A continuación se deben realizar ensayos de laboratorio para evaluar la actividad microbiana y poder definir las mejores condiciones que permitan optimizar su actividad metabólica (Silva Arroyave & Correa Restrepo, 2009).

En este caso es crucial el conocimiento de la interacción entre el suelo y los hidrocarburos al igual que la degradación natural de los mismos ya que esto se puede servir como un inicio para diseñar estrategias de biorremediación.

En la Tabla 5-11 se pueden ver las diferentes etapas de implementación de biorremediación.

**Tabla 5-11**

*Etapas de implementación de biorremediación*

<b>Etapas de implementación</b>
Información del sitio contaminado
Características fisicoquímicas del suelo contaminado
Cálculo de dosificación de nutrientes
Aplicación del tratamiento de biorremediación escala de laboratorio
Monitoreo de parámetros fisicoquímicos del suelo

### **Plan de monitoreo y seguimiento**

En el plan de monitoreo y seguimiento se deben monitorear los parámetros físicos, químicos y microbiológicos a lo largo del tratamiento de biorremediación al igual que la degradación del contaminante. Una vez finalizado el tratamiento es recomendable realizar pruebas de toxicidad y ecotoxicidad para verificar no solo la disminución del contaminante problema si no también verificar que las condiciones en las cuales quedó el suelo son óptimas para el desarrollo de las diferentes formas de vida que habitan en el suelo.

## **6. Conclusiones y recomendaciones**

### **6.1. Conclusiones**

Los porcentajes de biodegradación obtenidos en la presente investigación permiten la formulación de un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con crudo en condiciones anaerobias. Estas estrategias de biorremediación pueden ser usadas en suelos inundados, sedimentos marinos, humedales y en suelos de ríos, ya que en estos ambientes se presentan condiciones como la estudiada en esta investigación.

Los resultados de la concentración de HTP al final de los tratamientos de Bioestimulación y Bioaumentación muestran un aumento de los porcentajes de biodegradación de hidrocarburos en un 11,7% y un 23% respectivamente en relación con el tratamiento de Atenuación Natural, lo que indica la eficacia de ambos tratamientos.

Los porcentajes de biodegradación que se encontraron en esta investigación verifican la hipótesis planteada inicialmente, donde los tratamientos con surfactante poseen mayores porcentajes de biodegradación de HTP. Para el tratamiento de Bioaumentación con surfactante el aumento en el porcentaje de biodegradación en comparación con el tratamiento de Bioaumentación fue del 5,5% mientras que el aumento del porcentaje de biodegradación en el tratamiento de Bioestimulación con surfactante en comparación con el tratamiento de Bioestimulación fue del 2,5%. El aumento en los porcentajes de biodegradación confirma la utilidad del surfactante Tween 80 en los procesos de biorremediación en condiciones anaerobias, debido a que este solubiliza el hidrocarburo adherido a la matriz del suelo. Por otro lado los tratamientos de Bioestimulación con surfactante y Bioestimulación con surfactante y D-limoneno no presentaron diferencia en el porcentaje de biodegradación al finalizar el tratamiento.

Los satisfactorios porcentajes de biodegradación obtenidos en la presente investigación confirman la eficacia del proceso de biorremediación en condiciones anaerobias para un suelo contaminado con crudo. Los resultados conseguidos muestran que es posible llevar a una mayor escala el tratamiento de Bioestimulación con surfactante, debido a que es una tecnología eficaz, de bajo costo y amigable con el medio ambiente.

Aunque los hidrocarburos presenten en el suelo inicialmente contaminado son una fuente de carbono y energía estos no siempre se encuentran biodisponibles para los microorganismos, ya sea porque estos se encuentran fuera del alcance de los mismo,, se encuentran atrapados en los nano poros del medio o se encuentran adheridos a la matriz del suelo, por lo cual es importante agregar agentes como los surfactantes y solubilizantes que permitan una mayor biodisponibilidad de este tipo de contaminantes. Así mismo se encontró que la a adición de un sustrato secundario como la melaza aumenta los porcentajes de biorremediación ya que al ser una fuente de carbono fácil y rápida de degradar, los microorganismos pueden aumentar la densidad de población y a su vez aumentar la producción de enzimas degradadoras del contaminante.

La caracterización fisicoquímica del suelo antes del tratamiento de biorremediación permite obtener los parámetros necesarios para lograr un satisfactorio proceso de biodegradación empleando el método de McCarthy.

Aunque los porcentajes de biodegradación obtenidos en la presente investigación fueron mayores en los tratamientos de Bioestimulación, Bioestimulación con surfactante y Bioestimulación con surfactante y D-limoneno que en los tratamientos de Bioaugmentación y Bioaugmentación con surfactante, el potencial de hidrógeno (pH) en los tratamientos de bioestimulación se conservaron en valores cercanos a la neutralidad, por lo cual ofrece mejores condiciones para el crecimiento de la mayoría de las plantas y crecimiento de micoorganismo ya que estas se desarrollan mejor en estos valores de pH.

Se planea un plan de gestión ambiental que integre la bioestimulación con surfactante para el tratamiento de suelos contaminados con crudo en condiciones anaerobias. A partir de prueba a escala de laboratorio se encontraron parámetros fisicoquímicos que permiten la descontaminación del suelo. Para esto es necesario conocer las características del sitio contaminado, el tipo de contaminante, la normativa vigente, los costos de gestión y control de acciones correctivas.



## **6.2. Recomendaciones**

En futuras investigaciones se puede realizar tratamientos de biorremediación en sedimentos marinos, suelo de pantano o ríos colombianos, con el fin de estudiar comunidades microbianas presentes en ambientes reducidos y que empleen un aceptor de electrones diferente al oxígeno.

Realizar tratamientos de biorremediación en condiciones anaerobias usando diferentes aceptores de electrones como hierro, o sulfatos y comparar las tasas de degradación.

Realizar un análisis de la micro biota presente en los microcosmos para determinar que bacterias son las que predominan en el proceso de biorremediación a través de métodos de secuenciación masiva.

Efectuar no solo una detección de los gases producidos en los tratamientos de biorremediación si no también una cuantificación de los mismos a lo largo del tiempo que permita conocer los posibles productos del proceso de biorremediación y sus cantidades.

En futuras investigaciones se puede evaluar diferentes concentraciones de D-limoneno con lo que se puede determinar la concentración óptima que genere un efecto significativo en la degradación.



## A. Anexo: Determinación de la fórmula molecular del contaminante

El crudo que encuentra en las muestras de suelo proviene del Oleoducto TransAndino, el cual transporta petróleo desde Ecuador hasta Tumaco (Colombia). Al oleoducto confluye el crudo de varios pozos motivo por lo cual la composición exacta del hidrocarburo que se encuentra en las muestras de suelo no se conoce con seguridad. Para conseguir una fórmula representativa del crudo que se encuentra en las muestras de suelo se siguió el procedimiento sugerido por (Silva, Delerue-Matos, & Fiúza, 2005).

Para esto la muestra de suelo se sometió a un análisis de Cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS con lo que se identificaron los hidrocarburos presentan. Para el cálculo del hidrocarburo representativo se tomaron los compuestos con una probabilidad de coincidencia mayor al 90%.

Se encontró que los hidrocarburos con una probabilidad de coincidencia mayor al 90% corresponden a hidrocarburos alifáticos con número de carbonos entre 12 y 24.

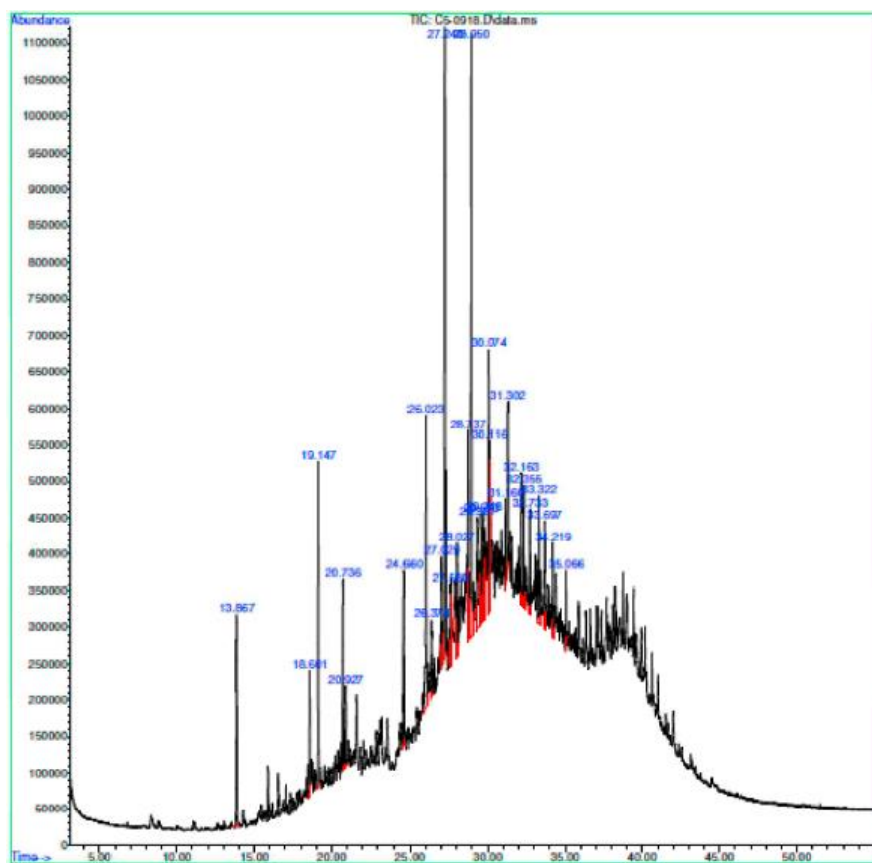
En la Tabla 6-1 se muestra el cálculo para obtener el compuesto representativo.

**Tabla 6-1**

Cálculo compuesto promedio representativo

Nombre	CAS	Carbono		Hidrógeno		Fracción máscica basada en la concentraci ón 90%	Carbon o	Hidroge no
		Númer o	Gramo s	Númer o	Gramo s			
Dodecano	112403	12	144	26	26	6,5	9,4	1,7
Tetradecano	629594	14	168	30	30	7,9	13,2	2,4
Hexadecano	544763	16	192	34	34	6,0	11,6	2,1
Pentadecano, 2,6,10 trimetil	4E+06	18	216	38	38	11,8	25,4	4,5

Heptadecano	629787	17	204	36	36	3,3	6,6	1,2
Pentadecano, 2,6,10,14 trimetil	2E+06	19	228	40	40	20,8	47,4	8,3
Octadecano	593453	18	216	38	38	9,0	19,4	3,4
Hexadecano, 6,10, 14 tetrametil	638368	20	240	42	42	19,3	46,3	8,1
Eicosano	112958	20	240	42	42	6,7	16,2	2,8
nonadecano, 1 cloro	6E+07	19	228	39	39	2,4	5,5	0,9
Docasano	629970	22	264	46	46	5,2	13,8	2,4
Tetracosano	646311	24	288	50	50	1,1	3,3	0,6
Total						100	218,1	38,3
Número de átomos promedio							18	38



## B. Anexo : Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos

Tabla 6-2

Análisis de varianza día 4-19

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	6,62294	2	3,31147	2,23	0,1887
Intra grupos	8,90807	6	1,48468		
Total (Corr.)	15,531	8			

Tabla 6-3

Análisis de varianza día 19-33

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	18,5689	2	9,28443	23,92	0,0014
Intra grupos	2,32849	6	0,388082		
Total (Corr.)	20,8974	8			

Tabla 6-4

Análisis de varianza día 33-47

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	26,9997	2	13,4998	11,47	0,0089
Intra grupos	7,06103	6	1,17684		
Total (Corr.)	34,0607	8			

Tabla 6-5

Análisis de varianza día 47-61

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	29,8944	2	14,9472	24,64	0,0013
Intra grupos	3,64023	6	0,606705		
Total (Corr.)	33,5346	8			

Tabla 6-6

Análisis de varianza día 61-77

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	30,2566	2	15,1283	29,21	0,0008
Intra grupos	3,10702	6	0,517836		
Total (Corr.)	33,3636	8			

Tabla 6-7

Análisis de varianza día 77-90

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	6,6019	2	3,30095	0,21	0,8132
Intra grupos	92,5231	6	15,4205		
Total (Corr.)	99,125	8			

Tabla 6-8

Potencial redox día (15-30) por prueba Scheffe

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BES	3	-6,09107	A
BE	3	-5,2028	A
BLS	3	-2,6986	B

Tabla 6-9

Potencial redox día (30-45) por prueba Scheffe

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BLS	3	-0,304767	A
BES	3	2,99047	B
BE	3	3,65713	B

Tabla 6-10

Potencial redox día (45-60) por prueba Scheffe

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BE	3	-5,96153	A
BLS	3	-2,3154	B
BES	3	-1,90767	B

Tabla 6-11

Potencial redox día (60-75) por prueba Scheffe

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BES	3	-4,09523	A
BLS	3	-2,64583	A
BE	3	0,310867	B

## C. Anexo : Detección de gases

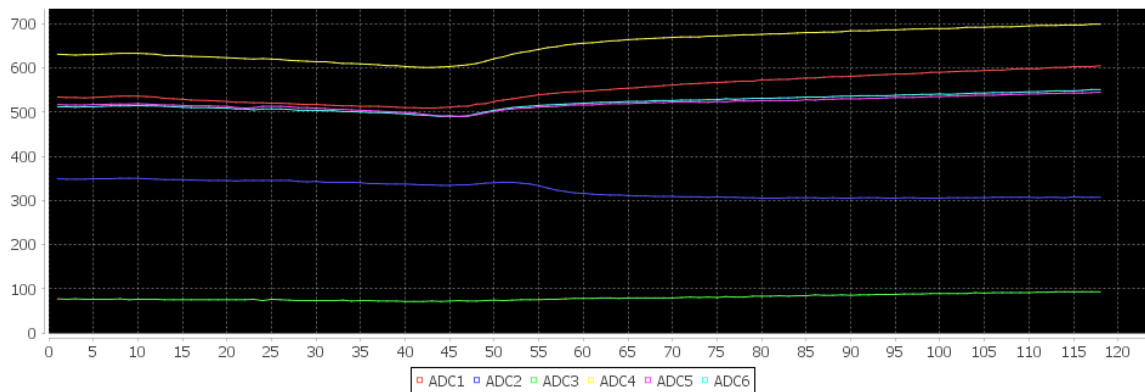


Figura 6-1 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Atenuación Natural

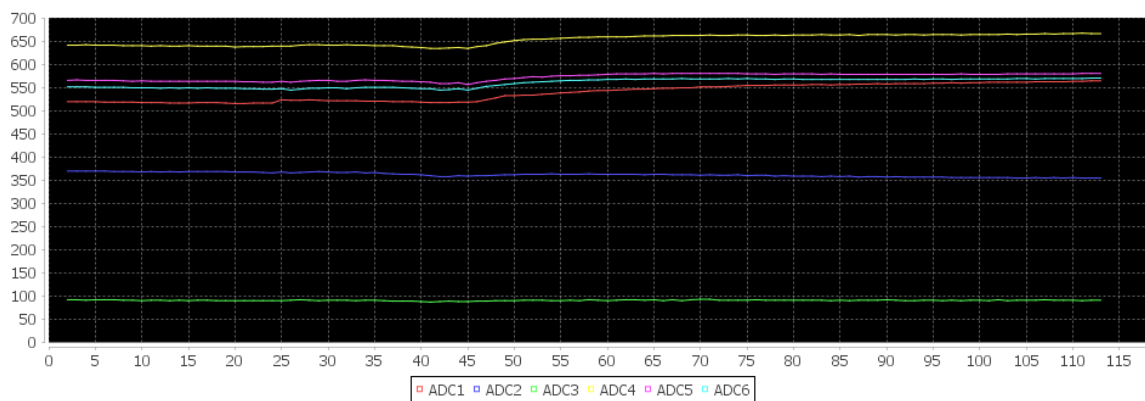


Figura 6-2 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioaumentación

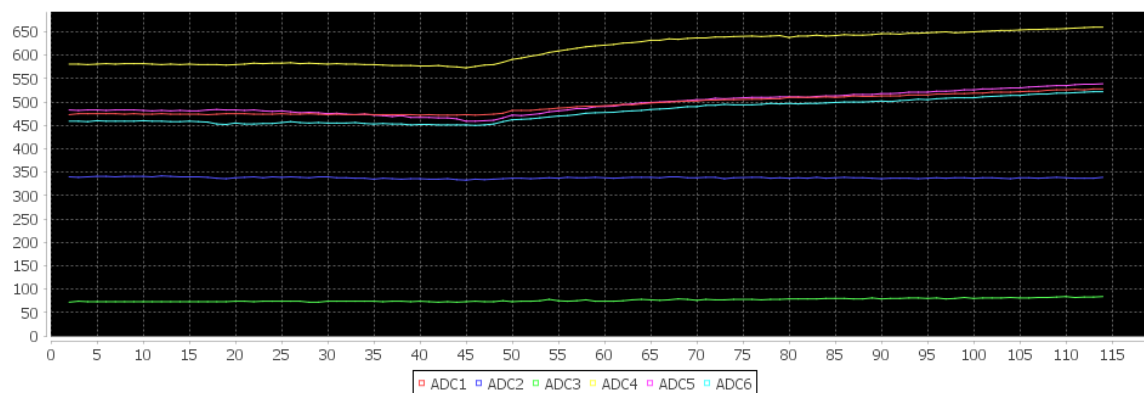


Figura 6-3 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioaumentación con surfactante

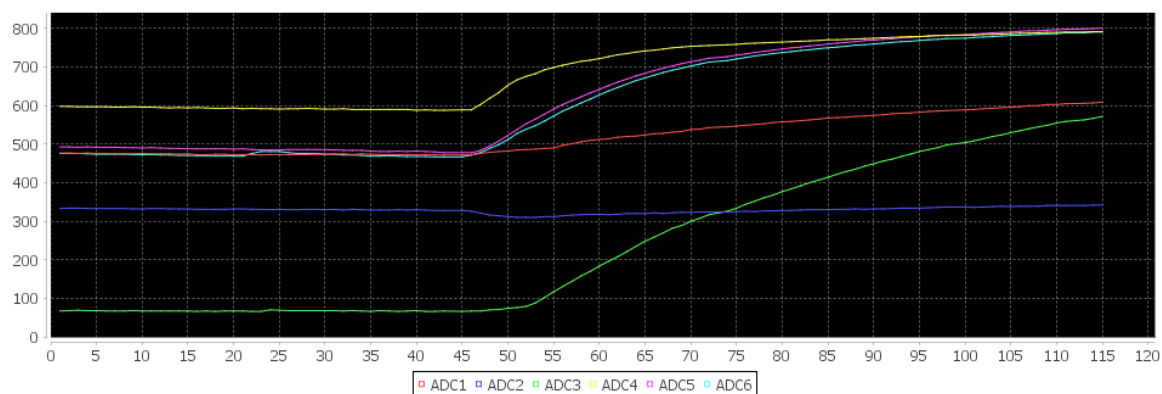


Figura 6-4 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioestimulación

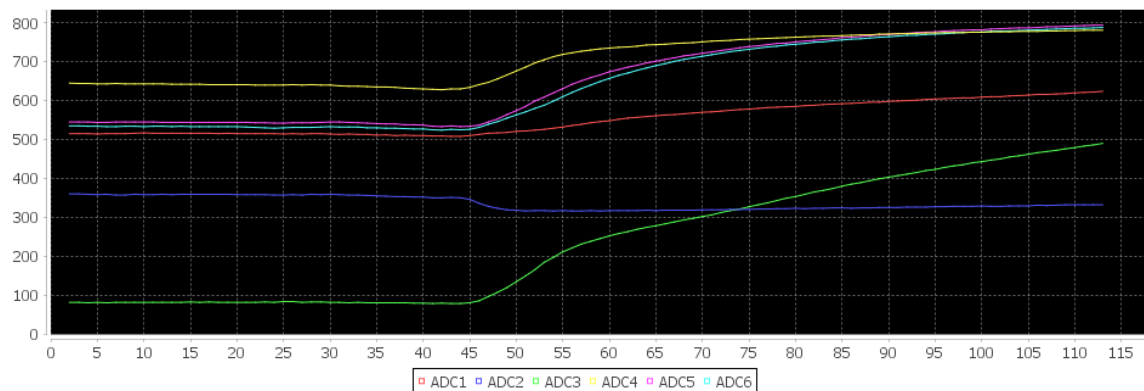


Figura 6-5 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioestimulación con surfactante



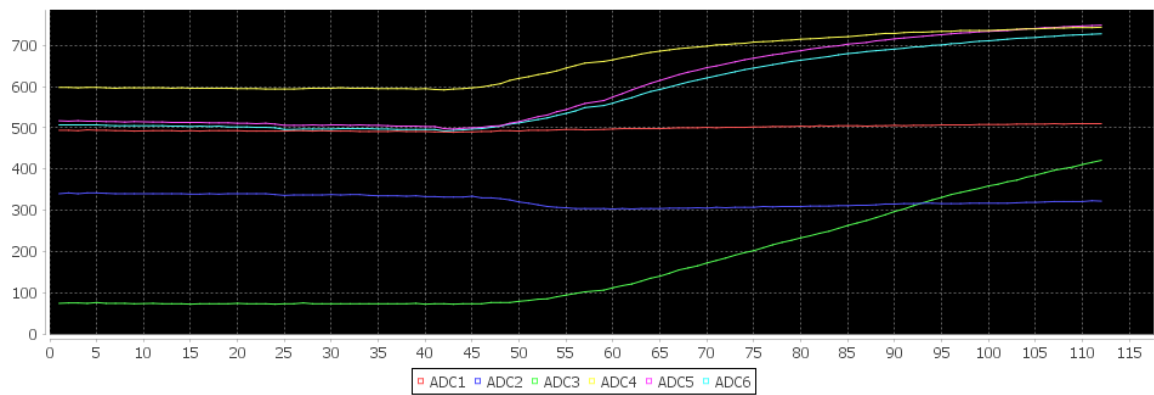


Figura 6-6 Detección de gases dispositivo SENose, segunda medida Bioestimulación con surfactante y D-limoneno

## Bibliografía

- Ahmend, T. (2006). *RESERVOIR ENGINEERING*. (ELSEVIER, Ed.) (Tercera Ed). Elsevier Ltd.
- Alonso Pinedo, J. (2014). *Evaluación de riesgos en suelos afectados por hidrocarburos de petróleo*. Universidad de Cantabria.
- Ambrosoli, R., Petruzzelli, L., Luis Minati, J., & Ajmone Marsan, F. (2005). Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. *Chemosphere*, 60(9), 1231–1236. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.030>
- Angel Sanint, E., Carmona Maya, S. I., & Villegas R., L. C. (2010). Gestion ambiental en proyectos de desarrollo. In *Métodos cuantitativos para la toma de decisiones* (Tercera, p. 236). Medellín.
- Arias Jiménez, A. C. (2001). *Suelos Tropicales*.
- Arrieta Ramírez, M. O. (2011). *Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diesel y su integración a la gestión ambiental*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Atagana, H. I., Haynes, R. J., & Wallis, F. M. (2003). The use of surfactants as possible enhancers in bioremediation of creosote contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 142, 137–149.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. (P. E. S.A, Ed.) (4th ed.). Madrid España.
- Barbieri, P. A., & Echeverría, H. E. (2003). Evolución de las pérdidas de amoníaco desde urea aplicada en Otoño y Primavera a una pastura de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 32, 17–29.
- Bento, F. M., Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., & Frankenberger, William, T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96, 1049–1055. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>
- Beolchini, F., Rocchetti, L., Regoli, F., & Dell'Anno, A. (2010). Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: Experimental analysis and kinetic modeling. *Journal of Hazardous Materials*, 182(1–3), 403–407. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.047>
- Bia, A., Davies, L., Albuquerque, A., & Randerson, P. F. (2012). Nitrogen removal

- from landfill leachate in constructed wetlands with reed and willow: Redox potential in the root zone. *Journal of Environmental Management*, 97, 22–27. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.11.014>
- Boopathy, R. (2003a). Anaerobic degradation of No. 2 diesel fuel in the wetland sediments of Barataria-Terrebonne estuary under various electron acceptor conditions. *Bioresource Technology*, 86(2), 171–175. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00162-1](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00162-1)
- Boopathy, R. (2003b). Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(3), 161–166. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00054-4](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00054-4)
- Boopathy, R. (2004). Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: A soil column study. *Bioresource Technology*, 94(2), 143–151. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.006>
- Born, M., Dörr, H., & Levin, I. (1989). Methane consumption in aerated soils of the temperate zone. In *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology* (Vol. 889). <http://doi.org/10.3402/tellusb.v42i1.15186>
- Bosques Vargas, J. H. (2010). *Curso básico de Hidroponia*.
- Bratkova, S., Nikolova, K., Chakalov, K., & Rilski, I. (2012). Potential for bioremediation of calcareous soils by rhizospheric bacteria and humic acids. *ANNUAL OF THE UNIVERSITY OF MINING AND GEOLOGY*, 55.
- Cabildo Mirando, M. del P., Cornago Ramírez, M. del P., Escolástico León, C., Esteban Santos, S., López García, C., & Sanz del Castillo, D. (2013). *Bases Químicas del Medio Ambiente*.
- Cai, M., Jiménez, N., Krüger, M., Guo, H., Jun, Y., Straaten, N., & Richnow, H. H. (2015). Potential for aerobic and methanogenic oil biodegradation in a water flooded oil field (Dagang oil field). *Fuel*, 141, 143–153. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.035>
- Chang, B.-V., Chang, I. T., & Yuan, S. Y. (2008). Anaerobic Degradation of Phenanthrene and Pyrene in Mangrove Sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(2), 145–149. <http://doi.org/10.1007/s00128-007-9333-1>
- Chang, B. V., Chang, S. W., & Yuan, S. Y. (2003). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge. *Advances in Environmental Research*, 7(3), 623–628. [http://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00047-3](http://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00047-3)
- Chang, B. V., Shiung, L. C., & Yuan, S. Y. (2002). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, 48(7), 717–724. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00151-0](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00151-0)
- Chen, W.-Y., Wu, J.-H., Lin, S.-C., & Chang, J.-E. (2016). Bioremediation of polychlorinated- p -dioxins / dibenzofurans contaminated soil using simulated compost-amended landfill reactors under hypoxic conditions. *Journal of*

- Hazardous Materials*, 312, 159–168. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.060>
- Chen, Y. D., Barker, J. F., & Gui, L. (2008). A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: A microcosm study. *Journal of Contaminant Hydrology*, 96(1–4), 17–31. <http://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.09.006>
- Chu, W., & Kwan, C. Y. (2003). Remediation of contaminated soil by a solvent / surfactant system. *Chemosphere*, 53, 9–15. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00389-8](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00389-8)
- CIAT. (1981). *Química de los suelos inundados*.
- Coates, J. D., Anderson, R. T., & Lovley, D. R. (1996). Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Sulfate-Reducing Conditions . These include : Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Sulfate-Reducing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 1099–1101.
- Coates, J. D., Anderson, R. T., Woodward, J. C., Phillips, E. J. P., & Lovley, D. R. (1996). Anaerobic Hydrocarbon Degradation in Petroleum-Contaminated Harbor Sediments under Sulfate-Reducing and Artificially Imposed Iron-Reducing Conditions. *Environmental Science & Technology*, 30(9), 2784–2789.
- Coates, J. D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., & Lovley, D. R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbour sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3589–3593.
- Dell'Anno, A., Beolchini, F., Gabellini, M., Rocchetti, L., Pusceddu, A., & Danovaro, R. (2009). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in anoxic marine sediments : Consequences on the speciation of heavy metals. *Marine Pollution Bulletin*, 58(12), 1808–1814. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.08.002>
- Dell'Anno, A., Beolchini, F., Rocchetti, L., Luna, G. M., & Danovaro, R. (2012). High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environmental Pollution*, 167, 85–92. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.043>
- Dinwiddie, M. T., Terry, P. D., & Chen, J. (2014). Recent evidence regarding triclosan and cancer risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(2), 2209–2217. <http://doi.org/10.3390/ijerph110202209>
- DOU, J., LIU, X., & HU, Z. (2008). Anaerobic BTEX degradation in soil bioaugmented with mixed consortia under nitrate reducing conditions. *Journal of Environmental Sciences*, 20(5), 585–592. [http://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62098-7](http://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62098-7)
- Ecopetrol. S.A. (2015a). Atentados contra infraestructura petrolera castigan a los colombianos más pobres y al medio ambiente. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/nuestra-empresa/sala->

de-prensa/boletines-de-prensa/Boletines 2015/Boletines 2015/atentados-castigan-colombianos-pobres-medio-ambiente/lut/p/z1/zVRNb9swDP0r28FHRfRXquzmZkA2p19btjXRJZBsOvFgS6qINm1\_\_Zhi

Ecopetrol. S.A. (2015b). Ecopetrol alerta sobre riesgos por instalación de válvulas ilícitas en Oleoducto Transandino. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/es/ecopetrol-web/nuestra-empresa/sala-de-prensa/boletines-de-prensa/Boletines 2015/Boletines 2015/Ecopetrol-alerta-riesgos-instalacion-valvulas-ilicitas-Oleoducto-Transandino>

Ecopetrol. S.A. (2015c). El drama social y ambiental de los atentados. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/especiales/revista-emas08/editorial.html>

Ecopetrol. S.A. (2015d). Válvulas ilícitas: ataques silenciosos al medio ambiente. Retrieved from <http://www.ecopetrol.com.co/especiales/revista-emas08/53.html>

EPA. (1991). Geochemical Characterization of the subsurface: Basic Analytical and statistical. In *Site Characterization for Subsurface Remediation*.

Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P. Y., & Schroeder, E. D. (2002). *PRINCIPIOS DE BIORRECUPERACION.pdf*.

Fajardo Castillo, E. E., & Sarmiento Forero, S. C. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyce cerevisiae*. Pontificia Universidad Jav.

Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carrillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., ... Arce Ortega, J. M. (2000). *Manual de técnicas de análisis de suelo aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. (Editorial del Deporte Mexicano, Ed.) *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Folwell, B. D., McGenity, T. J., Price, A., Johnson, R. J., & Whitby, C. (2016). Exploring the capacity for anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and naphthenic acids by microbes from oil-sands-process-affected waters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 214–221. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.016>

Galaz Montoya, M. L. (2007). *Efecto del dimetil sulfóxico (DMSO) en la fase lamelar del tensoactivo óxido de tetradecil-dimetilamina (C14DMAO)*. Universidad de Sonora.

Gisbert Blanquer, J. M., Ibáñez Asensio, S., & Moreno Ramón, H. (2010). La textura del suelo. *Universidad Politecnica de Valencia*, (January).

Gómez Jovel, W. A. (2009). *Evaluación de la atenuación natural estimulada en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel a escala de laboratorio*. Universidad Nacional de Colombia.

Greenleaf Ambiental Company. (2011). Análisis de riesgos ambientales.

- Grishchenkov, V. G., Townsend, R. T., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Bonner, J. S., & Boronin, A. M. (2000). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 35(9), 889–896. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00145-4](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00145-4)
- Hatzikioseyan, A. (2010). *Principles of bioremediation processes*. (G. Plaza, Ed.) *Trends in Bioremediation and Phytoremediation* (Vol. 661). Kerala, India.
- Hickey, A. M., Gordon, L., Dobson, A. D. W., Kelly, C. T., & Doyle, E. M. (2007). Effect of surfactants on fluoranthene degradation by *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 74, 851–856. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0719-5>
- Hummel, D. O. (2000). *Handbook of surfactant analysis Chemical, Physical-chemical and Physical Methods*.
- Izquierdo Romero, A. R. (2013). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo . Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*.
- Jaramillo, D. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia*. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jiang, Y., Brassington, K. J., Prpich, G., Paton, G. I., Semple, K. T., Pollard, S. J. T., & Coulon, F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161, 300–307. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.032>
- Kauppi, S., Sinkkonen, A., & Romantschuk, M. (2011). Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate : Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(2), 359–368. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.10.011>
- Khalladi, R., Benhabiles, O., Bentahar, F., & Moulai-mostefa, N. (2009). Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 1179–1184. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.024>
- Kim, I. S., Park, J., & Kim, K. (2001). Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Applied Geochemistry*, 16, 1419–1428.
- Kogbara, R. B., Ayotamuno, J. M., Worlu, D. C., & Fubara-Manuel, I. (2015). A Case Study of Petroleum Degradation in Different Soil Textural Classes. *Recent Patents on Biotechnology*, 1–15.
- Kolmans, E., & Vásquez, D. (1999). *Manual de Agricultura Ecológica Una introducción a los principios básicos y su aplicación*. La Habana: Grupo de Agricultura Orgánica de la Asociación Cubana de Técnicas Agrícolas y Forestales (ACTAF).

- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas en color*. (E. W. Konemas, Ed.). Ed. Médica Panamericana.
- Lee, M., Kang, H., & Do, W. (2005). Application of nonionic surfactant-enhanced in situ flushing to a diesel contaminated site. *Water Research*, 39, 139–146. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2004.09.012>
- Li, C.-H., Wong, Y.-S., & Tam, N. F.-Y. (2010). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron(III) in mangrove sediment slurry. *Bioresource Technology*, 101(21), 8083–8092. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.005>
- Li, C.-H., Wong, Y.-S., Wang, H.-Y., & Tam, N. F.-Y. (2015). Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO<sub>3</sub>. *Journal of Environmental Sciences*, 30, 148–156. <http://doi.org/10.1016/j.jes.2014.09.028>
- Li, C.-H., Zhou, H.-W., Wong, Y.-S., & Tam, N. F.-Y. (2009). Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. *Science of The Total Environment*, 407(21), 5772–5779. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.07.034>
- Liang, L., Song, X., Kong, J., Shen, C., Huang, T., & Hu, Z. (2014). Anaerobic biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a facultative anaerobe *Pseudomonas* sp. JP1. *Biodegradation*, 25, 825–833. <http://doi.org/10.1007/s10532-014-9702-5>
- Lipczynska-kochany, E., & Kochany, J. (2008). Humic substances in bioremediation of industrial wastewater — Mitigation of inhibition of activated sludge caused by phenol and formaldehyde. *Journal of Environmental Science and Health*, 37–41. <http://doi.org/10.1080/10934520801893675>
- Liu, Z., Jacobson, A. M., & Luthy, R. G. (1995). Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 145–151.
- Lladó, S., Solanas, A. M., Lapuente, J. de, Borràs, M., & Viñas, M. (2012). A diversi fi ed approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 435–436, 262–269. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.032>
- Lladó Fernández, S. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas*.
- Lyon, L. T., & Buckman, H. O. (1943). *The nature properties of soil*. (L. . Bailey, Ed.) (Cuarta Edi). New York: The Macmillan company.
- Mahajan, R. K., & Sharma, R. (2011). Analysis of interfacial and micellar behavior of sodium dioctyl sulphosuccinate salt (AOT) with zwitterionic surfactants in

- aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, (363), 275–283. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.049>
- Manresa, M. A., Solanas, A. M., Sabate, J., Viñas, M., & Abalos, A. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*, 15, 249–260.
- Martínez M, V. E., & López S., F. (2001). Efecto de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*, 19(1), 17.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Héctor, S., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1), 27–36. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572005000100006&..>
- Miller, R., Möbius, D., & Fainerman, V. B. (2001). Chemistry of surfactants. In *Surfactants: Chemistry, Interfacial Properties, Applications*. Elsevier Science.
- Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, & Colombia. (2007). Gestión integral de residuos o desechos peligrosos. Bases conceptuales. Retrieved from [http://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/sustancias\\_qu%25C3%25ADmicas\\_y\\_residuos\\_peligrosos/gestion\\_integral\\_respel\\_bases\\_conceptuales.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/sustancias_qu%25C3%25ADmicas_y_residuos_peligrosos/gestion_integral_respel_bases_conceptuales.pdf)
- Morales Quintana, L. A. (2007). *Estudio del proceso de transferencia de calor convectivo en nofluidos*. Fundación Universitaria del Norte.
- Navarro García, G., & Navarro García, S. (2014). *Fertilizantes: química y acción*. Ediciones Paraninfo, S.A.
- Naveed, M., Herath, L., Moldrup, P., Arthur, E., Nicolaisen, M., Norgaard, T., ... Jonge, L. W. De. (2016). Spatial variability of microbial richness and diversity and relationships with soil organic carbon , texture and structure across an agricultural field. *Applied Soil Ecology*, 103, 44–55. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.004>
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., & Kalogerakis, N. (2013). Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 72, 165–173. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.007>
- Orantes Gómez, J. L. (2002). *Aplicación de surfactantes en suelos contaminados con hidrocarburos*. Universidad Nacional Autonoma de México.
- Paramo Carrillo, J. (1992). *Crudos y Derivados*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Pineda, D. M., & Pérez, J. C. (2017). SENose : An under U \$ 50 electronic nose for the monitoring of soil gas emissions. *Computers and Electronics in Agriculture*,



- 133, 15–21. <http://doi.org/10.1016/j.compag.2016.12.004>
- Prada Vásquez, M. A. (2016). *Un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil)-etano (DDT) mediante un reactor de lecho estático*. Universidad Nacional de Colombia.
- Ratanaprommanee, C., & Shutsrirung, A. (2013). Chemical Properties and Potential Use in Agriculture of Leonardite from Different Sources in Thailand.
- Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. (McGraw-Hill, Ed.).
- Román, P., Martínez, M. M., & Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultor*.
- Scherr, K. E., Nahold, M. M., Lantschbauer, W., & Loibner, A. P. (2011). Sequential application of electron donors and humic acids for the anaerobic bioremediation of chlorinated aliphatic hydrocarbons. *New Biotechnology*, 29(1), 116–125. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.04.010>
- Schlumberger Oilfield. (2016). Oilfield Glossary. Retrieved from <http://www.glossary.oilfield.slb.com/Terms/p/petroleum.aspx>
- Siddique, T., Fedorak, P. M., & Foght, J. M. (2006). Biodegradation of Short-Chain n-Alkanes in Oil Sands Tailings under Methanogenic Conditions. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5459–5464. <http://doi.org/10.1021/es060993m>
- Silva, A., Delerue-Matos, C., & Fiúza, A. (2005). Use of solvent extraction to remediate soils contaminated with hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 124, 224–229. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.05.022>
- Silva Arroyave, S. M., & Correa Restrepo, F. J. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: Revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semestre Económico*, 12(23), 13–34. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/seec/v12n23/v12n23a2>
- Su, L., Zhou, H., Guo, G., Zhao, A., & Zhao, Y. (2012). Anaerobic biodegradation of PAH in river sediment treated with different additives. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 311–319. <http://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.044>
- Suja, F., Rahim, F., Raihan, M., Hambali, N., Razali, M. R., Khalid, A., & Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 115–122. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.006>
- Sun, M., Ye, M., Hu, F., Li, H., Teng, Y., Luo, Y., ... Orori, F. K. (2014). Tenax extraction for exploring rate-limiting factors in methyl- $\beta$ -cyclodextrin enhanced anaerobic biodegradation of PAHs under denitrifying conditions in a red paddy soil. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 505–513. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.032>
- Terrón, P. U. (1992). *Tratado de fototécnica general*. (Mundi-Prensa, Ed.)

(Reimpresa).

Tотора, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*.

Trejos Delgado, M. C. (2017). *Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo* María Catalina Trejos Delgado. Universidad Nacional de Colombia.

Turgay, O. C., Erdogan, E. E., & Karaca, A. (2010). Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. *Environ Moint Assess*, 45–58. <http://doi.org/10.1007/s10661-009-1213-1>

Turner, K. P. (2002). *Bioremediation of drill cuttings from oil based muds*. University of nottingham.

Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., ... Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158–164. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>

Xu, Y., & Lu, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1–3), 395–401. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.038>

Zhang, D., & Zhu, L. (2012). Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. *Environmental Pollution*, 164, 169–174. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.036>